

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

A duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV). Double strand short interference nucleic acid to check. (siNA) Are a molecule, one chain of said double strand siNA molecule is an antisense strand including a nucleotide sequence of HIV RNA, or a nucleotide sequence complementary to the part, and a chain of another side a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence of an antisense strand. A siNA molecule which is an included sense strand and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in said double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

[Claim 2]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-1 RNA.

[Claim 3]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-2 RNA.

[Claim 4]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule does not contain ribonucleotide.

[Claim 5]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule contains ribonucleotide.

[Claim 6]

The siNA molecule according to claim 1 in which all the pyrimidine nucleotides in a siNA molecule include sugar ornamentation.

[Claim 7]

An embellished pyrimidine nucleotide 2'-deoxy pyrimidine, 2'-O-alkyl pyrimidine, 2'-C-alkyl pyrimidine, 2'-deoxy 2'-fluoro-pyrimidine, 2'-aminopyrimidine, 2'-methoxy-ethoxypyrimidine, And the siNA molecule according to claim 6 chosen from independent or arbitrary combination of a 2'-O,4'-C-methylene pyrimidine nucleotide.

[Claim 8]

The siNA molecule according to claim 7 whose 2'-O-alkyl pyrimidine nucleotide is 2'-O-methyl or 2'-O-allyl.

[Claim 9]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to RNA which encodes HIV protein or its fragmentation in a nucleotide sequence of an antisense strand of a double strand siNA molecule.

[Claim 10]

The siNA molecule according to claim 1 complementary [chain / of a siNA molecule / each / including about 19 to about 29 nucleotides] to a nucleotide of a chain of another side in each chain which contains about 19 nucleotides at least.

[Claim 11]

The siNA molecule according to claim 1 in which said siNA molecule is assembled from two oligonucleotide fragmentation, one fragmentation includes a nucleotide sequence of an antisense strand of a siNA molecule, and the 2nd fragmentation includes a nucleotide sequence of a sense strand of a siNA molecule.

[Claim 12]

The siNA molecule according to claim 1 by which a sense strand is connected with an antisense strand via a linker molecule.

[Claim 13]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a polynucleotide linker.

[Claim 14]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a non-nucleotide linker.

[Claim 15]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in a sense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in a sense field are 2'-deoxy purine nucleotides.

[Claim 16]

The siNA molecule according to claim 1 to which an end cap ingredient exists including a three-dash terminal and a five prime end in both a five prime end of said sense strand, a three-dash terminal or a five prime end, and a three-dash terminal in a sense strand.

[Claim 17]

The siNA molecule according to claim 16 in which said end cap ingredient is a part for reversal deoxy salt-free Motonari.

[Claim 18]

The siNA molecule according to claim 1 in which an antisense strand contains 1 or a 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotide beyond it and 1, or a 2'-O-methyl purine nucleotide beyond it.

[Claim 19]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-O-methyl purine nucleotides.

[Claim 20]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes combination between phosphorothioate nucleotides in a three-dash terminal of said antisense strand.

[Claim 21]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes glyceryl ornamentation in a three-dash terminal of said antisense strand.

[Claim 22]

The siNA molecule according to claim 1 in which each chain of a siNA molecule contains 21 nucleotides.

[Claim 23]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule, and at least two three-dash terminal nucleotides of each chain of a siNA molecule do not carry out base pair formation to a nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

[Claim 24]

The siNA molecule according to claim 23 whose two three-dash terminal nucleotides of each fragmentation of a siNA molecule are 2'-deoxy pyrimidines.

[Claim 25]

The siNA molecule according to claim 24 whose 2'-deoxy pyrimidine is 2'-deoxy thymidine.

[Claim 26]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

[Claim 27]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of an antisense strand carry out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

[Claim 28]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of an antisense strand carry

out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

[Claim 29]

The siNA molecule according to claim 1 in which a five prime end of an antisense strand may contain a phosphate group arbitrarily.

[Claim 30]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of a 5'-untranslation region of HIV RNA, or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 31]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of HIV RNA which exists in RNA of all the HIV(s), or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 32]

A medicinal composition which contains the siNA molecule according to claim 1 in a carrier which can be permitted, or a diluent.

[Claim 33]

Drugs containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 34]

An active ingredient containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 35]

Are a duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV) use of a double strand short interference nucleic acid (siNA) molecule to check, and here, One side of a chain of a double strand siNA molecule HIV. A nucleotide sequence of RNA. Or a nucleotide sequence complementary to the part. Use which it is an included antisense strand, and a chain of another side is a sense strand which includes a complementary nucleotide sequence in a nucleotide sequence of an antisense strand, and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in a double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表2006-502694

(P2006-502694)

(5) int. Cl.	F 1	C 12 N	15/00	Z NAA	4 B 024	4 C 086	
(1)出願番号	特願2003-569153 (P2003-569153)	(2)出願日	平成15年2月20日 (2003.2.20)	(3)発表文提出日	平成16年8月16日 (2004.8.16)	(4)公表日	平成18年1月26日 (2006.1.26)
(4)国際出願番号	W02003/005190	(5)国際公開日	平成15年8月20日 (2003.8.20)	(6)優先権番号	60/358,580	(7)優先日	平成14年2月20日 (2002.2.20)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 126 頁)

【請求項 1】ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製を阻害する二本鎖短干涉核酸 (s i N A) 分子であつて、前記二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H i V - R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、前記二本鎖 s i N A 分子中に存在するビリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含むことを特徴とする s i N A 分子。

【請求項 2】H i V - R N A が H i V - 1 R N A を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 3】H i V - R N A が H i V - 2 R N A を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 4】s i N A 分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 5】s i N A 分子がリボヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 6】s i N A 分子中のすべてのビリミジンヌクレオチドが糖修飾を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 7】修飾されたビリミジンヌクレオチドが、2' - デオキシ - ビリミジン、2' - 0 - アルキルビリミジン、2' - C - アルキルビリミジン、2' - デオキシ - 2' - フルオロ - ビリミジン、2' - アミノビリミジン、2' - メトキシ - 2' - テキシ - 2' - ビリミジン、および 2' - 0、4' - C - メチレンビリミジンヌクレオチドの単独または任意の組み合わせから選択される、請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 8】2' - O - アルキルビリミジンヌクレオチドが 2' - 0 - メチルまたは 2' - 0 - アリルである、請求項 7 記載の s i N A 分子。

【請求項 9】一本鎖 s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列が、H i V 蛋白質またはそのフラグメントをコードする R N A に相補的である、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 10】s i N A 分子の各鎖が約 1.9 - 約 2.9 ヌクレオチドを含み、各鎖が他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約 1.9 ヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

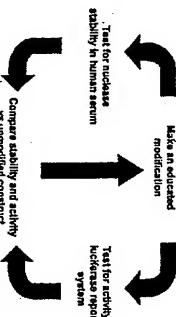
【請求項 11】前記 s i N A 分子が 2 つのオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、一方のフラグメントは s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第 2 のフラグメントは s i N A 分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 12】センス鎖がリンカーモノマーを介してアンチセンス鎖と連結されている、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 13】前記リンカーモノマーがボリヌクレオチドリンカーモノマーである、請求項 12 記載の s i N A 分子。

【請求項 14】前記リンカーモノマーが非ヌクレオチドリンカーモノマーである、請求項 12 記載の s i N A 分子。

【請求項 15】センス鎖に存在する任意のビリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドであり、センス鎖に存在する任意のブリンヌクレオチドが 2' - デオキシブリンヌクレオチドである、請求項 1 記載の s i N A 分子。



【請求項 1】本発明は、種々の用法、例えば、治療、診断、標的的面において、ヒト免疫不全ウイルス (H i V) の遺伝子発現を調節するのに有用な方法および試験に関する。詳細には、本発明は、H i V遺伝子の発現およびまたは活性に対する R N A 干渉 (R N A i) を媒介する小核酸分子、例えば、短干涉核酸 (s i N A)、短干涉 RNA (s i R N A)、二本鎖 RNA (d s R N A)、マイクロ RNA (m i R N A) A)、および短ヘアピン RNA (s h R N A) 分子に関する。小核酸分子は、H i V 感染、A I D S、および H i V の発現または活性の調節に応答する他の任意の疾病または病気の治療において有用である。

【請求項 2】【請求項 3】【請求項 4】

【請求項 5】

【請求項 6】

【請求項 7】

【請求項 8】

【請求項 9】

【請求項 10】

【請求項 11】

【請求項 12】

【請求項 13】

【請求項 14】

【請求項 15】

【請求項 16】

【請求項 17】

【請求項 18】

【請求項 19】

【請求項 20】

【請求項 21】

【請求項 22】

【請求項 23】

【請求項 24】

【請求項 25】

【請求項 26】

【請求項 27】

【請求項 28】

【請求項 29】

【請求項 30】

【請求項 31】

【請求項 32】

【請求項 33】

【請求項 34】

【請求項 35】

【請求項 36】

【請求項 37】

【請求項 38】

【請求項 39】

【請求項 40】

【請求項 1 6】
センス鎖が 3' 末端および 5' 末端を含み、前記センス鎖の 5' 末端、3' 末端、または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キャップ成分が存在する、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 7】
前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項 1 6 記載の s i N A 分子

【請求項 1 8】
アンチセンス鎖が、1 またはそれ以上の 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドおよび 1 またはそれ以上の 2' - 0 - メチルプリンヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 1 9】
アンチセンス鎖に存在する任意のビリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドであり、アンチセンス鎖に存在する任意のプリンヌクレオチドが 2' - 0 - メチルプリンヌクレオチドである、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 0】
アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 1】
アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の 3' 末端にグリセリル修飾を含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 2】
s i N A 分子の各鎖が 2' - ヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 3】
s i N A 分子の各鎖の約 1/9 ヌクレオチドが s i N A 分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i N A 分子の各鎖の少なくとも 2 つの 3' 末端ヌクレオチドが s i N A 分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項 2 2 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 4】
s i N A 分子の各フランメントの 2 つの 3' 末端ヌクレオチドが 2' - デオキシ - ビリミジンである、請求項 2 3 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 5】
アンチセンス鎖の約 1/9 ヌクレオチドが H I V R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項 2 2 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 6】
s i N A 分子の各鎖の 2' - ヌクレオチドが s i N A 分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項 2 2 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 7】
アンチセンス鎖の約 1/9 ヌクレオチドが H I V R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項 2 2 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 8】
アンチセンス鎖の 2' - ヌクレオチドが H I V R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項 2 2 記載の s i N A 分子。

【請求項 2 9】
アンチセンス鎖の 5' 末端が任意にリン酸基を含んでいてもよい、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 3 0】
アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部が H I V R N A の 5' - 非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 3 1】
前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項 1 6 記載の s i N A 分子。

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部が、すべての H I V の R N A 中に存在する H I V R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 3 2】
許容しうる相体または希釈剤中に請求項 1 記載の s i N A 分子を含む、医薬組成物。

【請求項 3 3】
請求項 1 記載の s i N A 分子を含む医薬品。

【請求項 3 4】
請求項 1 記載の s i N A 分子を含む活性成分。

【請求項 3 5】
ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の複製を阻害する二本鎖短干涉核酸 (s i N A) 分子の使用であつて、ここで、二本鎖 s i N A 分子の鎖の一方は H I V R N A のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i N A 分子中に存在するビリミジンヌクレオチドの大部が糖修飾を含むことを利用とする使用。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、M c S w i g g e n, 米国特許出願 6 0 / 3 9 8, 0 3 6 (2 0 0 2 年 7 月 2 3 日出願), M c S w i g g e n, 米国特許出願 1 0 / 2 2 5, 0 2 3 (2 0 0 2 年 8 月 2 9 日出願) に甚く優先権を主張する M c S w i g g e n, 米国特許出願 1 0 / 1 5 7, 5 8 0 (2 0 0 2 年 5 月 2 9 日出願), M c S w i g g e n, 米国特許出願 6 0 / 3 7 4, 7 2 2 (2 0 0 2 年 4 月 2 2 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 3 5 8, 5 8 0 (2 0 0 2 年 2 月 2 0 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 3 6 3, 1 2 4 (2 0 0 2 年 3 月 1 1 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 3 8 6, 7 8 2 (2 0 0 2 年 6 月 6 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 4 0 6, 7 8 4 (2 0 0 2 年 8 月 2 9 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 4 0 8, 3 7 8 (2 0 0 2 年 9 月 5 日出願), B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 4 0 9, 2 9 3 (2 0 0 2 年 9 月 5 日出願), および B e i g e l m a n, 米国特許出願 6 0 / 4 4 0, 1 2 9 (2 0 0 3 年 1 月 15 日出願) に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0 0 0 2】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の遺伝子発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾患の研究、診断、および治療のための化合物、組成物、および方法に関する。本発明はまた、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の発現および活性の経路に関する遺伝子の発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾患に関連する化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、H I V の遺伝子発現に対する R N A 干渉 (R N A i) を媒介する小核糖分子、例えば短干涉核酸 (s i N A)、短干涉 R N A (s i R N A)、二本鎖 R N A (d s R N A)、マイクロ R N A (m i R N A)、および短ヘアピン R N A (s h R N A) 分子に関連する。

【背景技術】

【0 0 0 3】
以下は R N A i に関する関連技術の説明である。この説明は、以下に記載される本発明を理解するためにのみ提供される。この概要是、以下に記載される研究のいすれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではない。
【0 0 0 4】
R N A 干渉とは、動物において短干涉 R N A (s i R N A) により媒介される配列特異

的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す(Fire et al., 1999, *Trends Genet.*, 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防衛は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポン要素のランダムインゲーションから生ずる二本鎖RNA(dsRNA)の生成に応答して、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞防衛により進化してきたのである。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPDK1および2',5'-オリゴアデニレートシンセターゼのdsRNA媒介活性化によるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

【0005】細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレオチドI-1-I-1(酵素)活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセシングして短干涉RNA(siRNA)として知られる短い断片のdsRNAにすることに応答している(Berstet et al., 2001, *Nature*, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干涉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュープレックスを含む(Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における闇号が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから2-1および2-2ヌクレオチドの小さな一時的RNA(siRNA)を切り出すことに応答している(Hutvagner et al., 2001, *Science*, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNAi誘導性サイレンシング複合体(RISC)と称されるエンチセンス鎖に相補的な配列を有する特徴とし、これはsiRNAデュープレックスのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、siRNAデュープレックスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる(Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15, 188)。

【0006】RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら(1998, *Nature*, 391, 806)は、C. elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WinnallおよびGoetz(1999, *Nature Cell Biology*, 2, 70)は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら(2000, *Nature*, 404, 293)は、dsRNAでトランسفェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら(2001, *Nature*, 411, 494)は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の2'-ヌクレオチドRNAのデュープレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚発育における最近の研究(Elbashir et al., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877)は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsirNAの長さ、構造、化学組成、および配列についての多くの要件を明らかにした。これらの研究は、2-1ヌクレオチドのsirNAデュープレックスは3'-末端ヌクレオチドオーバーハンプを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsirNA鎖を2'-デオキシヌクレオチド(2'-H)または2'-オーバーハンプヌクレオチドを2'-デオキシヌクレオチド(2',-H)で置換することを示された。また、sirNAデュープレックスの中心における单一のミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsirNAガイド配列の3'末端ではなく

【0007】

2ヌクレオチドの3'-オーバーハンプを有する21-merのsiRNAデュープレックスの3'末端ヌクレオチドのオーバーハンプしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えると、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。

【0008】RNAi活性がなくなる(Elbashir et al., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877)。さらに、Elbashirら(上掲)はまた、siRNAを2'-オーメチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。

【0009】L15(国際公開WO00/44914)およびBeachich(国際公開WO01/68836)は、siRNAがリン酸-糖骨格またはヌクレオシドのいすれかに塩基またはイオウ複素原子の少なくとも1つを含むよう修飾することができるなどを予備的に示す。

【0010】しかし、いざれの出願も、siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず、そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzlerら(カナダ特許出願2,359,180)もまた、dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPDKの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾、特に2'-アミノまたは2'-オーメチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン環を含むヌクレオチドを記載する。

【0011】しかし、Kreutzlerらも同様に、siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。

【0012】Partrishら(2000, *Molecular Cell*, 6, 1977-1087)は、C. elegansにおいて長い(>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。若者らは、T7およびT3 RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込ませることによりこれら

【0013】オエート修飾塩基を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに、Partrishらは、2段基より多いホスホロオエート修飾は、干涉活性をアッセイすることができないほど大きいくんピトロでRNAを不安定化させたことを報告する(同上, 1081)。若者らはまた、長いsiRNA転写産物中のヌクレオチド糖の2'-位におけるある種の修飾を試験して、リボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび5'-またはジチジンからデオキシリボヌクレオチジンへの置換の場合に、干涉活性が実質的に減少することを見いだした(同上)。さらに、若者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4'-チオウラシル、5'-ブロモウラシル、5'-ヨードウラシル、および3'-(アミノアリル)ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4'-チオウラシルおよび5'-ブロモウラシル置換は許容されたように見えたが、Partrishは、イノシンはいざれの鎖に取り込まれたときにも干涉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Partrishはまた、アンチセンス鎖における5'-ヨードウラシルおよび3'-(アミノアリル)ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

【0014】より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば、Beachich(国際公開WO01/68836)は、内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschl(国際公開WO01/75164)は、ショウジョウバエのイ

くガイド配列の5'末端により規定されることを示した(Elbashir et al., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュープレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることが示した(Nykanen et al., 2001, *Cell*, 107, 309)。

【0015】

2ヌクレオチドの3'-オーバーハンプを有する21-merのsiRNAデュープレックスの3'末端ヌクレオチドのオーバーハンプしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えると、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。

【0016】RNAi活性がなくなる(Elbashir et al., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877)。さらに、Elbashirら(上掲)はまた、siRNAを2'-オーメチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。

【0017】L15(国際公開WO00/44914)およびBeachich(国際公開WO01/68836)は、siRNAがリン酸-糖骨格またはヌクレオシドのいすれかに塩基またはイオウ複素原子の少なくとも1つを含むよう修飾することができるなどを予備的に示す。

【0018】しかし、いざれの出願も、siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず、そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzlerら(カナダ特許出願2,359,180)もまた、dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPDKの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾、特に2'-アミノまたは2'-オーメチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン環を含むヌクレオチドを記載する。

【0019】しかし、Kreutzlerらも同様に、siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。

【0020】Partrishら(2000, *Molecular Cell*, 6, 1977-1087)は、C. elegansにおいて長い(>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。若者らは、T7およびT3 RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込ませることによりこれら

【0021】オエート修飾塩基を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに、Partrishらは、2段基より多いホスホロオエート修飾は、干涉活性をアッセイすることができないほど大きいくんピトロでRNAを不安定化させたことを報告する(同上, 1081)。若者らはまた、長いsiRNA転写産物中のヌクレオチド糖の2'-位におけるある種の修飾を試験して、リボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび5'-またはジチジンからデオキシリボヌクレオチジンへの置換の場合に、干涉活性が実質的に減少することを見いだした(同上)。さらに、若者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4'-チオウラシル、5'-ブロモウラシル、5'-ヨードウラシル、および3'-(アミノアリル)ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4'-チオウラシルおよび5'-ブロモウラシル置換は許容されたように見えたが、Partrishは、イノシンはいざれの鎖に取り込まれたときにも干涉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Partrishはまた、アンチセンス鎖における5'-ヨードウラシルおよび3'-(アミノアリル)ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

【0022】より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば、Beachich(国際公開WO01/68836)は、内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschl(国際公開WO01/75164)は、ショウジョウバエのイ

【0023】

【0024】

【0025】

【0026】

【0027】

【0028】

【0029】

【0030】

【0031】

【0032】

【0033】

【0034】

【0035】

【0036】

【0037】

【0038】

【0039】

【0040】

【0041】

【0042】

【0043】

【0044】

【0045】

【0046】

【0047】

【0048】

【0049】

【0050】

【0051】

【0052】

【0053】

【0054】

【0055】

【0056】

【0057】

【0058】

【0059】

【0060】

【0061】

【0062】

【0063】

【0064】

【0065】

【0066】

【0067】

【0068】

【0069】

【0070】

【0071】

【0072】

【0073】

【0074】

【0075】

【0076】

【0077】

【0078】

【0079】

【0080】

【0081】

【0082】

【0083】

【0084】

【0085】

【0086】

【0087】

【0088】

【0089】

【0090】

【0091】

【0092】

【0093】

【0094】

【0095】

【0096】

【0097】

【0098】

【0099】

【0100】

【0101】

【0102】

【0103】

【0104】

【0105】

【0106】

【0107】

【0108】

【0109】

【0110】

【0111】

【0112】

【0113】

【0114】

【0115】

【0116】

【0117】

【0118】

【0119】

【0120】

【0121】

【0122】

【0123】

【0124】

【0125】

【0126】

【0127】

【0128】

【0129】

【0130】

【0131】

【0132】

【0133】

【0134】

【0135】

【0136】

【0137】

【0138】

【0139】

【0140】

【0141】

【0142】

【0143】

【0144】

【0145】

【0146】

【0147】

【0148】

【0149】

【0150】

【0151】

【0152】

【0153】

【0154】

【0155】

【0156】

【0157】

【0158】

【0159】

【0160】

【0161】

【0162】

【0163】

【0164】

【0165】

【0166】

【0167】

【0168】

【0169】

【0170】

【0171】

【0172】

【0173】

【0174】

【0175】

【0176】

【0177】

【0178】

【0179】

【0180】

【0181】

【0182】

【0183】

【0184】

【0185】

ジビトロ RNA 1 システム、およびある種の機能的ゲノム用途およびある種の治療用途に特定の siRNA 分子を用いることを記載する。しかし、Tuschl (2001, Chem. Biochem., 2, 239-245) は、インターフェロン応答の活性化の危険性のため、遺伝的疾患またはウイルス感染を治療するために RNAi を用いることができるとは疑わしいと述べている。Li (国際公開 WO 00/44914) は、ある種の遺伝子の発現を弱めるために特定の dsRNA を用いることを記載する。Zernicka-Goetz (国際公開 WO 01/36646) は、ある種の dsRNA 分子を用いて哺乳動物細胞において特別の遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載する。

Fire (国際公開 WO 99/32619) は、遺伝子発現の阻害に用いるためにある種の dsRNA 分子を細胞内に導入するための特別の方法を記載する。Piatelina (国際公開 WO 00/01846) は、特定の dsRNA 分子を用いて細胞において特別の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種の方法を記載する。McLachlan (国際公開 WO 01/29058) は、dsRNA 媒介性 RNAi に関する特定の遺伝子の同定を記載する。Deschamps-Delpaliette (国際公開 WO 99/07409) は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特別の dsRNA 分子からなる特定の組成物を記載する。Waterhouse (国際公開 99/53050) は、ある種の dsRNA を用いて植物細胞における核酸の表現型の発現を減少させるある種の方法を記載する。Disco (国際公開 WO 01/49844) は、IV 遺伝子、または H1V 遺伝子において遺伝子サイレンシングを促進するのに用いるための特定の DNA コンストラクトを記載する。

[0010]

他の者は、種々の RNAi および遺伝子サイレンシングシステムを報告している。例えば、Parryish (2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087) は、C. elegans unc-22 遺伝子を標的とする特定の化学的に修飾された siRNA コンストラクトを記載する。Grossniklaus (国際公開 WO 01/38551) は、植物においてある種の dsRNA を用いてポリコーム遺伝子発現を制御するためのある種の方法を記載する。Churikov (国際公開 WO 01/443) は、ある種の dsRNA を用いて生物の遺伝的特性を改変するある種の方法を記載する。Coboni (国際公開 WO 01/53475) は、Neurospora のサイレンシング遺伝子を単離するある種の方法およびその用途を記載する。Reed (国際公開 WO 01/68836) は、植物における遺伝子サイレンシングのある種の方法を記載する。Homer (国際公開 WO 01/70944) は、ある種の dsRNA を用いてハーキンソン病のモデルとしてトランジェンクリック線虫を用いる薬剤スクリーニングの方法を記載する。Deck (国際公開 WO 01/72774) は、ショウジョウバエにおける遺伝子産物を記載する。Arndt (国際公開 WO 01/92513) は、RNAi を増強する因子を用いて遺伝子抑制を媒介するある種の方法を記載する。Tuschl (国際公開 WO 02/44321) は、ある種の合成 siRNA コンストラクトを記載する。Pachuk (国際公開 WO 00/63364) および Sattishchandra (国際公開 WO 01/04313) は、ある種の dsRNA を用いてある種のポリヌクレオチド配列の機能を阻害するためのある種の方法を記載する。Echeverri (国際公開 WO 02/38805) は、RNAi により同定されたある種の C. elegans 遺伝子を記載する。Kreutzer (国際公開 WO 02/055692, WO 02/055693, および EP 1144623B1) は、RNAi を用いて遺伝子発現を阻害するある種の方法を記載する。Graham (国際公開 WO 99/49029 および WO 01/70949) および AU 4037501 は、ベクターから発現されるある種の siRNA 分子を記載する。Fire (US 6, 506, 559) は、RNAi を媒介するある長さの dsRNA (25 ネクレオチドより長い) を用いてインビトロで遺伝子発現を阻害するためのある種の方法を記載する。

[0011]

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、HIV-1 により引き起こされると考えられている。Drapier (米国特許 6, 159, 692, 5, 972, 704, 5, 693, 535, および WO 95/04818) は、HIV を標的とする酵素的核酸分子を記載する。Novina (2002, Nature Medicine, 8, 681-686) は、HIV-1 感染を標的とするある種の siRNA コンストラクトを記載する。Le (2002, Nature Biotechnology, 19, 500-505) は、HIV-1 感染を標的とするある種の siRNA を記載する。

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【0012】

【発明の概要】
本発明は、短干涉核酸 (siRNA) 分子を用いて RNAi 干渉 (RNAi) により、遺伝子、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染、および後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発達または維持に関連する遺伝子の発現を調節するのに有用な化合物、組成物および方法に関する。本発明は、また、小核酸分子、例えば、短干涉核酸 (siRNA)、短干涉 RNA (sirNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、マイクロ RNA (miRNA) および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子を用いて、RNA 干渉 (RNAi) により、HIV 遺伝子、または HIV 活性に関与する遺伝子または HIV 活性に関与する遺伝子の発現および活性を調節するのに有用な化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、HIV 遺伝子の発現を調節するのに用いられる小核酸分子、例えば、短干涉核酸 (siRNA)、短干涉 RNA (sirNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子および方法を特徴とする。本発明の siRNA は、修飾しなくともよく、化学的に修飾してもよい。本発明の siRNA は、化学的に合成してもよく、ベクターから発現させてもよく、酵素的に合成してもよい。本発明はまた、RNA 干渉 (RNAi) により細胞における HIV 遺伝子または活性を調節する種々の化学的に修飾された合成功干渉核酸 (siRNA) 分子を特徴とする。化学的に修飾された siRNA を使用することにより、インビオでのヌクレオチド配列に対する耐性的の増加、および、または細胞取り込みの改良のため、天然の siRNA 分子の種々の特性が改良される。さらに、細胞に発表された研究に反して、多くの化学的修飾を有する siRNA はその RNAi 活性を保持している。本発明の siRNA 分子は、種々の治療、診断、標的的調節、ゲノム発見、遺伝子工学、およびファーマコゲノミクスの用途に用い得る。

[0013]

【0013】
1 つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製を阻害する二本鎖干渉核酸 (siRNA) 分子を特徴とし、二本鎖 siRNA 分子の一方の鎖は、HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1 つの態様においては、HIV RNA は HIV-1 RNA を含む。別の態様においては、HIV RNA は HIV-2 RNA を含む。

【0014】
1 つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製を阻害する二本鎖干渉核酸 (siRNA) 分子を特徴とし、二本鎖 siRNA 分子の一方の鎖は、HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、二本鎖 siRNA 分子中に存在する大部分のヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、1 つの態様においては、二本鎖 siRNA 分子中に存在するすべてのヌクレオチドは修飾を含む。1 つの態様においては、二本鎖 siRNA 分子の各鎖は約 19-約 29 ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、二本鎖 siRNA 分子は 2 つ

-1のエンベロープ糖蛋白質の発現、例えば、HIV-1のエンベロープ糖蛋白質のgp 1,20およびgp 41サブユニットの発現を調節しうるsINA分子の選択および機能を記載する。これらのsINA分子は、HIV感染に伴う疾患および疾患を治療するために、またはHIV-1感染を防止する予防手段として用いることができる。

【0026】

一つの態様においては、本発明は、独立してまたは組み合わせて、HIV感染の細胞標的、例えば、細胞レセプター、細胞表面分子、細胞性酵素、細胞性転写因子、および細胞アセナセリ分子を示す遺伝子の発現を調節する1またはそれ以上のsINA分子および方法を特徴とする。

【0027】

本発明により企図される、HIV感染に関与するそのような細胞性レセプターの例としては、限定されないが、CD4レセプター、CXCR4(Fusin; LESTR; NPY3R)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-0034677;CCR5(CKR-5, CMKRB5)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-0034679;CCR3(CCC-CKR-3, CKR-3, CMKBR3)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-0018377;CCR2(CCR2b, CMKBR2)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-000647およびNM-000648);CCR1(CKR1, CMKBR1)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-001295);CCR4(CKR-4)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-005508);CCR8(ChemR1, TER1, CMKBR8)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-005201);CCR9(D6)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-006641およびNM-031200);CXCR2(IL-8RB)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-001557);S-TR-L33(Bonzo)としても知られる;TYMSTR、例えば、Genbank受託番号NM-00654);US28(CMKBR1, CX3CR1, GPR13)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-001337);GPR1(GPR1)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-005279);GPR15(B0B)としても知られる、GPR15、例えば、Genbank受託番号NM-005290);APIJ(アンジオテンシンレセプター様、AGTRL1)としても知られる、例えば、Genbank受託番号NM-005161);およびChemR23レセプター(例えば、Genbank受託番号NM-004072)が挙げられる。

10

【0030】

本発明により企図される、HIV感染に関与するサイトカインおよびセカンドメッセンジャーの例としては、限定されないが、腫瘍死因子-a(TNF-a)、例えば、Genbank受託番号NM-000594);インターロイキン-1a(IL-1a)、例えば、Genbank受託番号NM-000575);インターロイキン-6(IL-6)、例えば、Genbank受託番号NM-000600);ホスホリバーゼC(PLC)、例えば、Genbank受託番号NM-000933);および蛋白質キナーゼC(PKC)、例えば、Genbank受託番号NM-006255)が挙げられる。

【0031】

本発明により企図される、HIV感染に関与する細胞アセナセリ分子の例としては、限定されないが、シクロフィリン(例えば、PI1D)、例えば、Genbank受託番号NM-005038;PP1A、例えば、Genbank受託番号NM-006112;PP1B、例えば、Genbank受託番号NM-000942;PP1F、例えば、Genbank受託番号NM-00477;およびPP1C、例えば、Genbank受託番号NM-000943);有糸分裂促進物質活性蛋白質キナーゼ(MAPK1、例えば、Genbank受託番号NM-002745およびNM-138957);および細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK-キナーゼ)が挙げられる。

40

【0032】

本発明により企図される、HIV感染に関与する細胞アセナセリ分子の例としては、限定されないが、シクロフィリン(例えば、PI1D)、例えば、Genbank受託番号NM-005038;PP1A、例えば、Genbank受託番号NM-006112;PP1B、例えば、Genbank受託番号NM-000942;PP1F、例えば、Genbank受託番号NM-00477;およびPP1C、例えば、Genbank受託番号NM-000943);有糸分裂促進物質活性蛋白質キナーゼ(MAPK1、例えば、Genbank受託番号NM-002745およびNM-138957);および細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK-キナーゼ)が挙げられる。

【0033】

sINA分子は、HIV感染または後天性免疫不全症候群(AIDS)を治療するために出いるよう適合させることができる。sINA分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができ、前記アンチセンス領域は、HIV RNA配列に相補的な配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的な配列を含む。sINA分子は、2つの核酸フラグメントから組み立てることができ、一方のフラグメントは前記sINA分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記sINA分子のアンチセンス領域を含む。センス領域およびアンチセンス領域は、リンカーモノマーを介して連結されてもよく、例えば、リンカーモノマーを介して共有結合により連結されていてもよい。リンカーモノマーはポリヌクレオチドリソウカーダーであってもよい。

【0034】

本発明により企図される、HIV感染に関与する細胞性酵素の例としては、限定されないが、N-ミリストイルトランスフェラーゼ(NMT1)、例えば、Genbank受託番号NM-021079およびNM-004808);グリコシル化酵素(例えば、Genbank受託番号NM-000303, NM-013339, NM-003358, NM-005787, NM-002408, NM-00291)が挙げられる。

50

11

4

一つの態様においては、本発明は、HIV-1 RNAに対するRNA活性を有するsINA分子を特徴とし、sINA分子は、HIV-1のコーディング配列を有する遺伝子のRNAに相補的な配列、例えば、Genbank受託番号AJ302647の配列を含む。別の態様においては、本発明は、HIV-2 RNAに対するRNA活性を有するsINA分子を特徴とし、sINA分子は、HIV-2のコーディング配列を有する遺

【0045】
本発明の1つの態様においては、s i N A分子は約1.9-約2.9ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、H I V蛋白質をコードするRNA配列に相補的であり、前記s i N Aはさらに、約1.9-約2.9(例えば、約1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5または2.6, 2.7, 2.8または2.9)ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約1.9の相補的ヌクレオチドを有する別々のヌクレオチド配列である。

【0046】

本発明の別の態様においては、本発明のs i N A分子は、約1.9-約2.9(例えば、約1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8または2.9)ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、H I V蛋白質をコードするRNA配列に相補的であり、前記s i N Aはさらに、約1.9-約2.9ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約1.9の相補的ヌクレオチドを有する別々のヌクレオチド配列である。

【0047】

本発明の1つの態様においては、s i N A分子はH I V蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。s i N Aはさらにセンス鎖を含み、前記センス鎖は、H I V遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

【0048】

別の態様においては、s i N A分子は、H I V蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。s i N A分子はさらにセンス鎖を含み、前記センス鎖はH I V遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

【0049】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、H I V遺伝子によりコードされるR N Aの発現を調節するRNA I活性を有する。H I V遺伝子は互いにあり程度の配列をモロジーを共有することができるため、s i N A分子は、種々のH I V癌的の間で共有されている配列を選択することにより一群のH I V遺伝子(および関連するレセプターまたはリガンド遺伝子)を標的とするように、あるいは、特定のH I V癌的にユニークな配列を選択することにより特定のH I V遺伝子を標的とするように、設計することができる。したがって、1つの態様においては、s i N A分子は、1つのs i N A分子でいくつかのH I V遺伝子(例えば、異なるH I V株、スプライシング変異、変異体遺伝子等)を標的とするように、いくつかのH I V遺伝子の間でモロジーを有するH I V RNA配列の保存領域を標的とするよう設計することができる。別の態様においては、s i N A分子がRNA I活性を媒介するために必要とされる高度の特異性のため、s i N A分子は、特定のH I V RNA配列にユニークな配列を標的とするよう設計することができる。

【0050】

1つの態様においては、RNA干涉による遺伝子サイレンシング応答のメディエータとして作用する本発明の核酸分子は二本鎖核酸分子である。別の態様においては、本発明のs i N A分子は、約1.9-約2.5(例えば、約1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4または2.5)ヌクレオチドを含むヌクレオチドの間に約1.9塩基対を含むデューブレックスから構成される。さらに別の態様においては、本発明のs i N A分子は、約1-約3(例えば、約1, 2, または3)ヌクレオチドのオーバーハング末端を有するデューブレックス、(例えば、約1, 2, または3)ヌクレオチドを有し、3'末端ヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約2.1ヌクレオチドのデューブレックスを含む。

【0051】

1つの態様においては、本発明は、H I Vを発現する核酸分子、例えばH I V蛋白質をコードするRNAに対する特異性を有する、またはそれ以上の化学的に修飾されたs i

N Aコントラクトを特徴とする。そのような化学的修飾の非限定期例には、固定されないが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-0-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、および万能塩基ヌクレオチド、"非羅状"ヌクレオチド、5'-C-メチルヌクレオチド、および末端グリセリルおよびまたは反応ヌクレオキシ基塩基の取り込みが含まれる。これらの化学的修飾は、種々のs i N Aコントラクト中で用いた場合、細胞においてRNA I活性を保持し、同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に増加させることができている。さらに、Partrishら(上掲)により公表されたデータに反して、本発明においては、多数(2以上)のホスホロチオエート置換が充分に許容され、修飾s i N Aコントラクトの血清安定性を実質的に増加させることができた。

【0052】

1つの態様においては、本発明のs i N A分子は、RNA Iを媒介する能力を維持しながら、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを用いて、インピビトロまたはインピボでの特性、例えば安定性、活性、および/または生物利用性を改良することができる。例えば、本発明のs i N A分子は、s i N A分子中に存在するヌクレオチドの総数のパーセンテージとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。すなわち、本発明のs i N A分子は、一般に、約5%-約100%の修飾ヌクレオチド(例えば、5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%または100%の修飾ヌクレオチド)を含むことができる。所定のs i N A分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実際のパーセンテージは、s i N A中に存在するヌクレオチドの総数によって異なるであろう。s i N A分子が一本鎖である場合、修飾のパーセントは一本鎖s i N A分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。同様に、s i N A分子が二本鎖である場合、修飾のパーセントは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。

【0053】

非限定期例においては、核酸分子中に化学的に修飾されたヌクレオチドを導入することは、外的にデリバリーされる天然のRNA分子に固有の、インビボ安定性および生物利用率の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば、化学的に修飾された核酸分子は血清内でより長い半減期を有する傾向にあるため、化学的に修飾された核酸分子を用いることにより、所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることができ。さらに、ある種の化学的修飾は、特定の細胞または組織を標的とすることにより、核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比較したときに低いとしても、分子の改良された安定性および/またはデリバリーのため、修飾核酸分子の全般的活性は天然の分子よりも高い可能性がある。天然の非修飾s i N Aとは異なり、化学的に修飾されたs i N Aはまた、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化する可能性を最小限にすることができる。

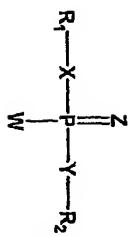
【0054】

本発明のs i N A分子のアンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の3'末端にホスホチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。アンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の5'末端に約1-約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本発明のs i N A分子の3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸糖基、または骨格で化学的に修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の万能塩基リボヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

【0055】

本発明の1つの態様は、本発明の少なくとも1つのs i N A分子をコードする核酸配列

【化1】 1つの懸念においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系において H1Vに対する RNA 干渉 (RNai) を媒介する化学的に修飾された短干涉核酸 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式1：



式中、 α は α の α である。

卷之三

【0058】 1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系に：

いて HIV に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介する化学的に修飾された短干涉 RNA (siRNA) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 11 :

The diagram shows a 3D coordinate system with axes labeled R₁ through R₁₁. The axes are represented by lines originating from a central point. R₁ and R₂ are vertical axes. R₃ and R₁₀ are horizontal axes. R₄ and R₅ are diagonal axes. R₆ and R₇ are diagonal axes. R₈ and R₉ are diagonal axes. R₁₁ is a diagonal axis.

【0060】
1つの様態においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてHIVに対するRNA干涉(RNAi)を媒介する化学的に修飾された短干涉核(SiNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式III:

【0060】
1つの様様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてHIVに対するRNA干渉(RNAi)を媒介する化学的に修飾された短干涉核糖核酸(siRNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式111：

〔三〕

【001】 1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインシピトロ系に接してHIVに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短小渉核酸

卷之三

10

〔式中〕
各 R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₁₀、R₁₁ および R₁₂ は、独立して、H、
OH、アルキル、置換アルキル、アルカリルまたはアラルキル、F、Cl、Br、
N、CF₃、OCF₃、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-SH、アルキ
ケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、O-アルケニル、S-OH、S-アルキ
ル-OH、O-アルキル-OH、O-アルケニル、S-OH、S-アルキル-OH、S-アルキ
ル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO₂、NO₂、N₃、

〔五四〕 各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル、またはアルキルハロであり；W、X、YおよびZはすべてOではない】
を有する5、末端リン酸基を含む。

〔式4〕
各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロドであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル、またはアルキルハロドであり；W、X、YおよびZはすべてOではない】
を有する5'-末端リソ酸基を含む。
【0064】

0-アミノ酸、0-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ボリアルキルアルアミノ、置換シリル、または式1を有する基であり；R9は、O、S、CH₂、S=O、CHF₂またはCF₂であり、Bは、ヌクレオシド基、例えば、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、2-アミノアデノシン、5-メチルシトシン、2、6-ジアミノプリン、または燐のRNAに相補的であっても相補的でなくともよいように用いる他の任意の天然に生じない塩基、またはヌクレオシド基、例えは、フェニル、ナフチル、3-ニトロビロール、5-ニトロビロール、ネオブライン、ピリドン、ピリジン、または標的RNAに相補的であっても相補的でなくともよい他の任意の天然に生じない万能塩基である】

この疑惑においては、本光明は、細胞の内部をまたは構成されたトロリスにて、

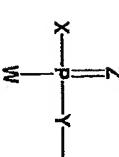
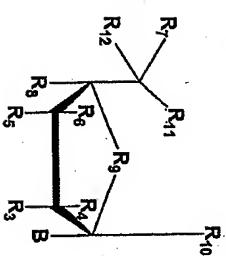
[00611]

式 I-11 の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは、s₁ N A デューネンセス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の s₁ N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の s₁ N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の双方に、1 またはそれ以上の式 I-11 の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。例えば、本発明の例示的 s₁ N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5' 末端に、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I-11 の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。別途の非限定的例においては、本発明の例示的 s₁ N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端に、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上) の式 I-11 の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。

4

別の様様においては、本発明の s i N A 分子は、式 I または I - I を有するヌクレオチドを含み、ここで、式 I または I - I を有するヌクレオチドは反転のコンフィギュレーションである。例えば、式 I または I - I を有するヌクレオチドは、s i N A コンヌクレオチドは、3' - 3'、3' - 2'、2' - 3'、または 5' - 5' コンヌクレオチドである。例えば、s i N A 鎮の一方または双方の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に結合させることができる。

၅၁



〔五〕
各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロドであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル、またはアルキルハロドであり；W、X、YおよびZはすべてOではない】
を有する5、末端リン酸基を含む。
【0064】
1つの態様においては、本発明は、標的一相補的鎖、例えは、標的R.N.A.に相補的な鎖に式I-Vを有する5、末端リン酸基を有するs_nN.A分子を特徴とし、ここで、s_nN.A分子は、全R.N.A.s_nN.A分子を含む。別の態様においては、本発明は、標的一相補鎖に式I-Vを有する5、末端リン酸基を有するs_nN.A分子を特徴とし、ここで、s_nN.A分子は、一方または両端方の鎖の3'、末端には約1-約4個（例えは、約1、2、3、または4個）のデオキシリボヌクレオチドを有する、約1-約3（例えは、約1、2、または3）又クレオチドの3'、末端又クレオチドオーバーハンクを含む。別の態様においては、式I-Vを有する5、末端リン酸基は、本発明のs_nN.A分子、例えは式I-VIIIにいずれかを有する化学的修飾を有するs_nN.A分子の標的一相補的鎖に存在する。
【0065】

〔式中、
各XおよびYは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロドであり；各ZおよびWは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル、またはアルキルハロドであり；W, X, YおよびZはすべてOではない〕
およびZはすべてOではない]
およびZはすべてOではない]
を有する5'末端リーン酸基を含む。

【0064】

1つの態様においては、本発明は、標的一相補的鎖、例えば、標的RNAに相補的な鎖に式IVを有する5'末端リーン酸基を有するs_nNA分子を特徴とし、ここで、s_nNA分子は、全RNA s_nNA分子を含む。別の態様においては、本発明は、標的一相補的鎖に式IVを有する5'末端リーン酸基を有するs_nNA分子を特徴とし、ここで、s_nNA分子はまた、一方または両方の鎖の3'末端に約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)のデオキシリボヌクレオチドを有する、約1-約3(例えば、約1, 2, または3)ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む。別の態様においては、式IVを有する5'末端リーン酸基は、本発明のs_nNA分子、例えば式I-VI-1のいずれかを有する化学的修飾を有するs_nNA分子の標的一相補的鎖に存在する。

【0065】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系に本

〔五〕
 各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロド、S-アルキル、アルカリール、アルキル、またはアルキルハロドであり；W、X、YおよびZはすべてOではない]を有する5'末端リン酸基を含む。
 [0064]
 1つの核酸においては、本発明は、標的一相補的鎖、例えば、標的RNAに相補的な鎖に式IVを有する5'末端リン酸基を有するs_nNA分子を特徴とし、ここで、s_nNA分子は、全RNA-s_nNA分子を含む。別の核酸においては、本発明は、標的一相補的鎖に式IVを有する5'末端リン酸基を有するs_nNA分子を特徴とし、ここで、s_nNA分子はまた、一方または両方の鎖の3'末端に約1-約4個(例えば、約1、2、3、または4個)のデオキシリボヌクレオチドを有する、約1-約3(例えば、約1、2、または3)ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む。別の核酸においては、式IVを有する5'末端リン酸基は、本発明のs_nNA分子、例えば式I-IV-1Cにいずれかを有する化学的修飾を有するs_nNA分子の標的一相補的鎖に存在する。
 [0065]
 1つの核酸においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてHIVに対するRNA干渉(s_nNA)を媒介する化学的に修飾された短干渉核酸(s_nRNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1.またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的においては、本発明は、一方のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。また、それはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、本発明は、両方のs_nNA鎖に独立して約1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(s_nNA)を特徴とする。また、別の標的においては、本発明は、両方のs_nNA鎖に独立して約1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸(s_nNA)を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、s_nNAデュープレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のs_nNA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'

三

〔証明〕
各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロドであり；各ZおよびWは、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル、またはアルキルハロドであり；W、X、YおよびZはすべてOではない】
を有する5'末端リン酸基を含む。

オチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上、例えばすべてのヌクレオチド間結合は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができ、またはs i N A分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上、例えばすべてのヌクレオチド間結合は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0072】

別の態様においては、本発明の化学的に修飾されたs i N A分子は、2つの鎖を有するデューブレックスを含み、この一方または両方を化学的に修飾することができ、各鎖は約1.8 - 約2.7 (例えば、約1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, または2.7) ヌクレオチドの長さであり、デューブレックスは約1.8 - 約2.3 (例えば、約1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, または2.3) 塩基対を有し、化学的修飾は、式I - VI Iのいずれかを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は2つの鎖を有するデューブレックスを含み、この一方または両方は式I - VI Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく、各鎖は約2.1ヌクレオチドからなり、それそれは2ヌクレオチドの3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有し、デューブレックスは約1.9塩基対を有する。別の態様においては、本発明のs i N A分子は一本鎖ヘアピン構造を有し、ここで、s i N Aは約3.6 - 約7.0 (例えば、約3.6, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5、または7.0) ヌクレオチドの長さであり、約1.8 - 約2.3 (例えば、約1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, または2.3) 塩基対を有し、s i N Aは式I - VI Iのいずれかまたはそれらの組み合わせを有する構造を含むことができる。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - VI Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された、約4.2 - 約5.0 (例えば、約4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9、または5.0) ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドは約1.9塩基対および2ヌクレオチドの3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有するヘアピン構造を形成する。別の態様においては、本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子はステムループモチーフを含み、ここで、s i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビットの分解により3'、末端オーバーハンク、例えば約2ヌクレオチドを含む3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有する二本鎖s i N A分子が生成されるようによく修飾される。

【0073】

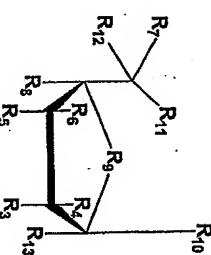
別の態様においては、本発明のs i N A分子は環状核酸分子を含み、ここで、s i N Aは約3.8 - 約7.0 (例えば、約3.8, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5、または7.0) ヌクレオチドの長さであり、約1.8 - 約2.3 (例えば、約1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2、または2.3) 塩基対を有し、s i N Aは化学的修飾を含むことができ、これは式I - VI Iのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は、式I - VI Iのいずれかまたはそれらの組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約4.2 - 約5.0 (例えば、約4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9、または5.0) ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドは約1.9塩基対および2ヌクレオチドの3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有するヘアピン構造を形成する。別の態様においては、本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子はステムループモチーフを含み、ここで、s i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビットの分解により3'、末端オーバーハンク、例えば約2ヌクレオチドを含む3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有する二本鎖s i N A分子が生成されるようによく修飾される。

【0074】

別の態様においては、本発明の環状s i N A分子は、2つのループモチーフを含み、ここで、s i N A分子のループ部分の一方または両方は生物分解性である。例えば、本発明の環状s i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビットの分解により、3'、末端ヌクレオチドを含む3'、末端ヌクレオチドオーバーハンクを有する二本鎖s i N A分子が生成することができるように設計される。

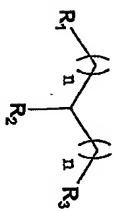
【0075】

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上) の無塩基成分、例えば、式V: 【化5】



卷之三

[72]



別の態様においては、本発明は、R₁およびR₂はヒドロキシル(OH)基であり、R₃はOを含み、かつ本発明の二本鎖S-NA分子の一方または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方への、または本発明の一本鎖S-NA分子への結合の点である、式VIを有する化合物を特徴とする。この修飾は、本明細書において"ゲリセリル"と称される(例えば、図10の修飾6を参照)。

別の意味に分子の 3', 末端, 5', 末端, または 3', 末端および 5', 末端の両方に存在する。例えは、式 V, V I または V II を有する成分は、s i N A 分子のアンチセンヌ鎖, センス鎖, またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の 3', 末端, 5', 末端, または 3', 末端および 5', 末端の両方に存在することができる。さらに、式 V II を有する成分とは、本明細書に記載されるように、ヘアピン s i N A 分子の 3', 末端または 5', 末端に存在する。

〔0080〕
別の態様においては、本発明の siRNA 分子は、式 V または VI を有する無端基残基を含み、ここで、式 VI または VI' を有する無端基残基は、 $3' - 3'$ 、 $3' - 2'$ 、 $2' - 2'$ 、 $3' - 3$ 、または $5' - 5'$ コンフィギュレーションで、例えば、一方または両方の si A 鎮の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方で siRNA コンストラクトに結合している。

【0082】
1 0 0 8 1
1 つめの実験においては、本発明の siRNA 分子は、例えば、 siRNA 分子の 5' 末端
3' 末端、 5' 末端および 3' 末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて
1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそ
以上）のロック核酸（LNA）ヌクレオチドを含む。

〔上〕の非環状又クレオチドを含む。
〔0083〕
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s_1NA がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干涉核酸 (s_1NA) 分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) ピリミジンヌクレオチドに存在するテオキシ (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) ピリミジンヌクレオチドは、 $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドである)。かつ、センス領域中に存在する任意の (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) ピリミジンヌクレオチドは、 $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドである (例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが $2'-$ フルオロピリミジンヌクレオチドである)。

〔0084〕
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された siNA がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短子説核酸 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の (例えは、1またはそれ以上、またはすべての) ピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシー-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えは、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシー-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドで)

あるか、あるいは複数のビリミンスクレオチドか一テオキシ-2-ノルロヒドロキシ-3-ヌクレオチドである)、かつ、センス領域中に存在する任意の(例えは、1オミドではそれ以上、またはすべての)プリンスクレオチドは2-「テオキシプリンスクレオチドであるか、あるいは複数のプリンスクレオチドが2-「テオキシプリンスクレオチドである)、ここに、前記センス領域中に存在する3、末端スクレオチドオーバーハンクを含む任意のヌクレオチドは2-「テオキシヌクレオチドである。

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されたS-I-N-Aがアンチセンス領域を介して、本発明の化学的に修飾された短干涉核糖（S-I-N-H）分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ビリミジンヌクレオチドは2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドであり、例えば、すべてのビリミジンヌクレオチドが2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは2'、-0-メチルフルアリンヌクレオチドである（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルフルアリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルフルアリンヌクレオチドである）。

【0056】 以上の複数においては、本発明は、化学的に修飾されたs i N Aがアンチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干扰核酸(s i N A)分子を得微とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の(例えば、1またはそれ以上、またはすべての)ピリミジンヌクレオチドは2,-デオキシ-2,-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2,-デオキシ-2,-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2,-デオキシ-2,-フルオロピリミジンヌクレオチドである、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の(例えば、1またはそれ以上、またはすべての)プリンヌクレオチドは2,-0-メ

【0088】
ルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルプリンヌクレオチドである）、ここで、前記アンチセンス領域中に存在する3'、末端ヌクレオチドオーバーハンジを含む任意のヌクレオチドは2'、-テオキシヌクレオチドである。
【0087】
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されたs i N Aがアンチセンス領域を含む本発明の化学的に修飾された短い核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ビリミジンヌクレオチドは2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのビリミジンヌクレオチドが2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが2'、-テオキシ-2'、-フルオロビリミジンヌクレオチドである）。かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）プリンヌクレオチドは2'、-テオキシプリンヌクレオチドである（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'、-テオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、-テオキシプリンヌクレオチドである）。

1つの機械においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインヒトロ系においてHIVに対するRNA干涉（RNAi）を媒介して、本発明の化学的修飾された短干涉核酸（siRNA）分子を特徴とし、ここで説明された技術は、また、siRNAを介して細胞を含むマテリアル内に核酸を導入する方法を示す。

は2'、一デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えは、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'、一デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'、一デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'、一デオキシプリンヌクレオチドであり（例えは、すべてのプリンヌクレオチドが2'、一デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、一デオキシプリンヌクレオチドである）、および、センス領域の3'、末端、5'、末端、または3'、末端、および5'、末端の両方に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに約1-約4個（例えは、約1、2'、3'、または4個）の2'、一デオキシヌクレオチドを有する3'、末端オーバーハンプを含んでいてもよく；かつ、化学生物的に修飾された右側核糖分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'、一デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチド（例えは、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'、一フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'、一デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは2'、-0-メチルプリンヌクレオチドであり（例えは、すべてのプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、-0-メチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えは、本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいすれかの修飾を含み、これは任意に、アンチセンス配列の3'、末端、5'、末端、または3'、末端および5'、末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらには任意に、約1-約4個（例えは、約1、2'、3'、または4個）の2'、一デオキシヌクレオチドを有する3'、末端ヌクレオチドオーバーハンプを含んでいてもよく、ここでオーバーハンプヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えは、1、2'、3'、または4個）のボスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾されたs i N Aの非臨定的例は図4および5および本明細書の表I-1-IおよびI-Vに示される。

【00889】 1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系にお

(28) Jp 2006-502694 A 2006.1.26

1つの発明においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインヒビトロ系に短時間でHIVに対するRNA干涉（RNAi）を操作し得る本発明の技術を用いて、RNAiは細胞修飾された細胞において、RNAiによるRNA干涉が得られる。

テオキシ-2',-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えは、すべてのピリミジンヌクレオチドが2',-テオキシ-2',-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2',-テオキシ-2',-フルオロピリミジンヌクレオチドである）。例えは、センス領域中に存在する1またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2',-テオキシヌクレオチド、ロツク核酸（LNA）ヌクレオチド、2',-メトキシエチルヌクレオチド、4',-チオヌクレオチド、および2',-0-メチルヌクレオチドからなる群より選択され（例えは、すべてのプリンヌクレオチドが2',-テオキシヌクレオチド、ロツク核酸（LNA）ヌクレオチド、2',-メトキシエチルヌクレオチド、4',-チオヌクレオチド、および2',-0-メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2',-テオキシヌクレオチド、ロツク核酸（LNA）ヌクレオチド、4',-チオヌクレオチド、および2',-0-メチルヌクレオチドからなる群より選択される）、かつ、任意にセンス領域の3',末端、5',末端、または3',末端および5',末端の両方に反転ヌオキシ無基修飾が存在していてもよく、センス領域はさらに任意に約1-約4個（例えは、約1, 2, 3, または4個）の2',-テオキシリボヌクレオチドを有する3',末端オーバーハングを含んでいてもよく；かつ、化学的に修飾された短干涉核酸分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2',-

2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えば,すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか,あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである), アンチセントス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは, 2' - デオキシヌクレオチド, ロック核酸 (LNA) ヌクレオチド, 2' - テキシエチルヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチド, および 2' - 0 - メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか, あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチド, 2' - メトキシエチルヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチドからなる群より選択されるか, あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチド, 2' - メトキシエチルヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチドからなる群より選択されるか, あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチド, 2' - メトキシエチルヌクレオチド, 4' - テオヌクレオチド, および 2' - 0 - メチルヌクレオチドからなる群より選択される), および末端キャップ修飾, 例えば, 本明書に記載されるかまたは図 1 に示されるいずれかの修飾を行み, これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在していてもよく, アンチセンス領域はさらに任意に, 約 1 - 約 4 個 (例えば, 約 1, 2, 3, または 4 個) の 2' - デオキシヌクレオチドオーバーハングを含んでいてもよく, ここで, オーバーハングヌクレオチドはまたはそれ以上 (例えば, 1, 2, 3, または 4 個) のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0091】

別の態様においては, 本発明の siNA 分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは, 好ましくは, 本発明の siNA 分子のアンチセンス鎖に存在するが, また任意に, センスおよび/またはアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に存在していてもよく, これは, 天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む. 例えば, 本発明は, ノザンコンコンヌクレオチド (例えば, ノザン偽回転サイクル, 例えは, Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer Lab ed., 1984 を参照) を有する修飾ヌクレオチドを含む siNA 分子を特徴とする. このように, 本発明の siNA 分子のアンチセンス鎖に存在するが, また任意にセンスおよびセンス鎖を媒介する能力を維持する. ノザンコンコンヌクレオチドは, 好ましくは, 本発明の siNA 分子中に存在してもよく, これはヌクレアーゼ分解に対して耐性であると同時に RNA 1 の両方に存在してもよく, これはヌクレアーゼ分解に対して耐性であると同時に RNA 1 を媒介する能力を維持する. ノザンコンコンヌクレオチド (例えば, 2' - 0, 4' - C - メ定的例としては, ロック核酸 (LNA) ヌクレオチド; 2' - メトキシエトキシ (MOE); ヌクレオチド (D-リボフルノシル) ヌクレオチド; 2' - フルオロヌクレオチド; 2' - メチルヌクレオチド; 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド, および 2' - 0 - メチルヌクレオチドが挙げられる。

【0092】

1 つの態様においては, 本発明は, 細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において HIV に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しする化学的に修飾された短干涉核酸分子 (siNA) を特徴とし, ここで, 化学的修飾は, 化学的に修飾された siNA 分子に共有結合したコンジュゲートを含む. 別の態様においては, コンジュゲートを介して共有結合している. 1 つの態様においては, コンジュゲート分子は, 化学的に修飾された siNA 分子のセントス鎖, アンチセントス鎖、または両方の鎖の 3' 末端に結合している. さらに別の態様においては, コンジュゲート分子は, 化学的に修飾された siNA 分子のセントス鎖, または両方の鎖の 3' 末端の鎖の 5' 末端に結合している. さて、これらの態様においては, コンジュゲート分子は, 化学的に修飾された siNA 分子のセントス鎖, または両方の鎖の 3' 末端の鎖の 5' 末端に結合している. 1 つの態様においては, 本発明のコンジュゲート分子は, 化学的に修飾された siNA 分子の生物学的においては, 本発明のコンジュゲート分子は, 化学的に修飾された siNA 分子に結合している。

システム (例えば細胞) へのデリバリーを促進する分子を含む. 別の態様においては, 化学的に修飾された siNA 分子に結合したコンジュゲート分子は, ポリエチレングリコール, ヒト血清アルブミン, または細胞取り込みを媒介することができる細胞レセプターのリガンドである. 化学的に修飾された siNA 分子に結合させることができる, 本発明により企図される特定の化合物の例は, Varigesele (米国特許出願 No. 201, 394, 本明書の一部としてここに引用する) に記載される. 用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明の siNA 分子のコンジュゲーションの程度は, 同時に siNA が RNAi 活性を媒介する能力を維持しながら, siNA コンストラクトの改良された薬物動態学プロファイル, 生物利用性, および/または安定性について評価することができる. このように, 当業者は, 例えば, 当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて, 総合的なコンジュゲート複合体が siNA コンストラクトをスクリーニングして, siNA コンジュゲート複合体が RNAi を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

【0093】

1 つの態様においては, 本発明は, siNA がさらに siNA のセンス領域と siNA のアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド, 非ヌクレオチド, または混合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリンカーを含む本発明の短干涉核酸 (siNA) 分子を特徴とする. 1 つの態様においては, 本発明のヌクレオチドリンカーは, 2'ヌクレオチド以上の長さである. 別の態様においては, 又ヌクレオチドリンカーは, ヌクレアーナ/アブタマーであつてもよい. 別の態様においては, "アブタマー"または"核酸アブタマー"とは, 潜的分子により認識される配列を意味し, ここで, 核酸分子は, その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する. あるいは, アブタマーは天然には核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であつてもよい. 標的分子は目的とする任意の分子でありうる. 例えは, アブタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ, このことにより, 天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができる. これは非限定的例であり, 当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう (例えは, Gold et al., 1995, Ann. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Current Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820; および Jayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628 を参照)。

【0094】

さらに別の態様においては, 本発明の非ヌクレオチドリンカーには, 無機基ヌクレオチド, ポリエーテル, ポリアミン, ポリアミド, ペプチド, 咸水化物, 脂質, ポリ炭化水素, または他のポリマー性化合物 (例えは, ポリエチレングリコール, 例えは 2 - 100 個のエチレングリコール単位を有するもの) が含まれる. 特定の例としては, Seeley and Kaiser, Nucleic Acids Res., 1990, 75: 6353 および Nucleic Acids Res., 1987, 75: 3113; Cioad and Schepratz, J. Am. Chem. Soc., 1991, 173: 6324; Richardson and Schepratz, J. Am. Chem. Soc., 1991, 73: 5109; Mat et al., Nucleic Acids Res., 1993, 27: 2585 および Biochemistry 1993, 32: 1751; Durand et al., Nucleic Acids Res., 1990, 75: 6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 10: 287; J. Schek et al., Tetrahedron Lett., 1993, 34: 301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30: 9914; Arnold et al., 国際公開 WO 90/0914

089/02439; U.S. man. et al., "国際公開WO 95/06731; Du dy c z et al.", 国際公開WO 95/11910およびReferenz und Verdine, J. M. C. Chem. Soc., 1991, 773: 4000 (すべて本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるものが選択される。"非ヌクレオチド"はさるに、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに糖および/またはリボ核酸環のいずれかにより核糖鎖中に取り込むことができ、残りの塩基がその酵素活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、般に認識されている又クレオチド塩基、例えばアデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを、例えば糖のC-1位に含まない場合、無塩基でありうる。

16001

1つの酵母においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインヒビト由系において、2つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てられたs i N A分子の一方または両方の鎖はリボヌクレオチドを含まない。例えば、s i N A分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで、s i N Aのセンス領域およびアンチセンス領域、オリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド（例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド）を有しない別々のオリゴヌクレオチドを含む。別の一例においては、s i N A分子は単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、ここで、s i N Aのセンス領域およびアンチセンス領域は、本明細書に記載されるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリソナーカーにより連結されているか環化されており、オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド（例えば2'-OH基を有するヌクレオチド）を有しない。本出願人は、驚くべきことに、R N A I 活性を支持するためには、s i N A分子中ににおけるリボヌクレオチド（例えば、2'-ヒドロキシル基を有するヌクレオチド）の存在が必需または必須ではないことを見いだした。したがって、1つの酵母においては、s i N A中すべての位置は、s i N A分子が細胞におけるR N A I 活性を支持する能力が維持される程度で、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド、例えばI₁, I₁, I₁, I₄, V, V, VI,またはV₁を有するヌクレオチドまたは非ヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

1つの態様においては、本発明の s_1NA 分子は、細胞または再構成されたインビット口系において RNA_1 活性を媒介する一本鎖 s_1NA 分子であり、ここで、 s_1NA 分子は、 RNA_1 構成の核酸配列に対して相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含む。別の態様においては、本発明の一本鎖 s_1NA 分子は、5'-末端リソブリン酸基を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖 s_1NA 分子は、末端リソブリン酸基および3'-末端リソブリン酸基(例えば、 $3',5'-環状ヌクレオチド$)を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖 s_1NA 分子は、約1.9-約2.1環状ヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、本発明の一本鎖 s_1NA 分子は、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。例えば、細胞中において s_1NA 分子が RNA_1 活性を支持する能力が維持される程度に、 s_1NA 分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば式I-VIIのいずれかを有するヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

1つの態様においては、本発明の s t I N A 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系において R N A I 活性を媒介する一本鎖 s t I N A 分子であり、ここで、 s t I N A 分子は、標的の核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、 s t I N A 中に存在する 1 またはそれ以上のビリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのビリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロビリミジンヌクレオチドである）、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' - 0 - メチルプリンヌクレオチドで

あり、「例えば、すべてのアーリンクレオチドが2'-0-メチルアーリンクレオチドであるか、あるいは複数のアーリンクレオチドが2'-0-メチルアーリンクレオチドであるか」、および末端クリップ修飾、例えば「本明細書に記載されるかまたは図1に示される任意の修飾を含め、これは任意にアンセムス配列の3'、末端、5'、末端または3'、末端および5'、末端の両方に存在してもよく、s1NAはさらに任意に、s1NA分子の3'、末端に約1'-約4個(例えば、約1、2、3、または4個)の末端2'、-デオキシクレオチドを含んでいてもよく、ここで、末端2'クレオチドはさらに1またはそれ以上(例えは、1、2、3、または4個)のホスホロチオエート又クレオチド間結合を含むことができるか、s1NAはさらに任意に末端リソ酸基、例えば5'、末端リソ酸基を含むことができるか」。

100981
 1. 本発明においては、s i N A 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてs i N A i 活性を媒介する一本鎖s i N A 分子であり、ここで、s i N A 分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、s i N A 中に存在する1またはそれ以上のビリミジンヌクレオチドは2、一デオキシー-1、一フルオロビリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのビリミジンヌクレオチドが2、一デオキシー-2、一フルオロビリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが2、一デオキシー-2、一フルオロビリミジンヌクレオチドである）、およびアンセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2、一デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2、一デオキシプリンヌクレオチドであるかあるいは複数のプリンヌクレオチドが2、一デオキシプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンセンス配列の3、末端、5、末端、または3、末端および5、末端の両方に存在してもよく、s i N A はさらに任意にs i N A 分子の3、末端に約1-約4個（例えば、約1、2、3、または4個）の末端2、一デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1、2、3、または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、s i N A はさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

在する、またはそれ以上のビリミジンヌクレオチドは2'、-デオキシ-2'、-フルオロピリミジンヌクレオチドが2'、-デオキシ-2'、-フルオロヒリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが2'、-デオキシ-2'、-フルオロヒリミジンヌクレオチドである、およびアンセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'、-メトキシエチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'、-メトキシエチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'、-メトキシエチルプリンヌクレオチドである）、および末端キヤップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図1-0に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンセンス配列の3'、末端、5'、末端、または3'、末端および5'、末端の両方に存在してもよく、s i N Aはさらに任意に、s i N A分子の3'、末端に約1-約4個（例えば、約1、2、3、または4個）の末端2'、-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらにまたはそれ以上（例えば、1、2、3、または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド結合を含むことができ、s i N Aはさらに任意に、末端リジン酸基、例えば5'、末端リジン酸基を含むことができる。

【01011】別の態様においては、本発明の一本鎖s i N A分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノサンコンフォーメーション（例えば、ノサン偽回転（ps e u d o r o t a t i o n）サイクル（例えば、S a e n g e r, P r i n c i p l e s o f N u c l e i c A c i d S t r u c t u r e, S p r i n g e r - V e r a g e d., 1984を参照）を有する修飾ヌクレオチドを含むs i N A分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好みしくは、ヌクレアーゼ分解に耐性であり、同時にR N A 1を媒介する能力を維持する。このように、本発明の一本鎖s i N A分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好みしくは、ヌクレアーゼ分解に耐性であり、同時にR N A 1を媒介する能力を維持する。このことを含む。

【01012】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、このことを含む。

【01013】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてH I V遺伝子を合成し、これは化学的に修飾して特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）細胞におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を細胞に導入する、このことを含む。

30

【01014】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）細胞に導入する、このことを含む。

40

を含む。

【01015】一つの態様においては、本発明のs i N A分子は、エクスピボ用途において試薬として用いられる。例えば、治療効果のために被験者の中に移植される組織または細胞にs i N A試薬を導入する。細胞および/または組織は、その後に外植片を受ける生物または被験者由来であつてもよく、移植された場合に細胞または組織が所望の表現型を獲得し、または機能を実行しうるよう、細胞または組織における1またはそれ以上の遺伝子の発現を調節することができる。一つの態様においては、ある種の標的細胞が患者から抽出される。これらの抽出細胞は、これらの細胞によるs i N Aの取り込みに適した条件下で（例えば、カチオン性脂質、リボソーム等などのデリバリー試薬を用いて、またはエレクトロポレーションなどの方法を用いて、細胞へのs i N Aのデリバリーを促進することにより）、細胞内の特定のヌクレオチド配列を標的とするs i N Aと接触させる。次に、細胞を同じ患者または他の患者に再導入する。

【01016】一つの態様においては、本発明は、外植組織においてH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）外植組織中でH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する外植組織の細胞に導入する、このことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物においてH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、外植組織をその組織が由来する生物に導入するかまたは別の生物に導入することを含む。

【01017】一つの態様においては、本発明は、組織外植片においてH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に導入することを含む。

【01018】一つの態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に導入することを含む。

【01019】別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）組織外植片におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を特定の生物に由来する外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に導入することを含む。

【01020】一つの態様においては、本発明は、生物においてH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入することを含む。

【01021】一つの態様においては、本発明は、生物において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入することを含む。

【01022】別の態様においては、本発明は、生物において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入することを含む。

【01023】別の態様においては、本発明は、生物において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入することを含む。

【01024】別の態様においては、本発明は、生物において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）生物におけるH I V遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i N A分子を生物に導入することを含む。

【01025】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のH I V遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（a）本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A鎖の一方はH I V遺伝子のR N Aに相補的な配列を含み；そして（b）細胞に導入する、このことを含む。

50

b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs₁NA分子を生物導入することを含む。

【0112】

1つの態様においては、本発明は、細胞内においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs₁NA分子を細胞に導入する、ことを含む。

【0113】

別の態様においては、本発明は、細胞内においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s₁NA分子をインビトロまたはインビオで細胞と接触させる、ことを含む。

【0114】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s₁NA分子をインビトロまたはインビオで細胞と接触させる、ことを含む。

【0115】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s₁NA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞と導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に展すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0116】

別の態様においては、本発明は、生物においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs₁NA分子を生物に導入する、ことを含む。

【0117】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s₁NAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs₁NA分子を生物に導入する、ことを含む。

【0118】

1つの態様においては、本発明は、生物におけるHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs₁NA分子と接触させることを含む。生物を本発明のs₁NA分子と接触させることを含む。

【0119】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する

方法を特徴とし、該方法は、生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を1またはそれ以上の本発明のs₁NA分子と接触させることを含む。

【0120】

本発明のs₁NA分子は、種々のRNA分子を標的とするRNAiにより標的(HIV)遺伝子の発現が阻害されるよう設計することができる。1つの態様においては、本発明のs₁NA分子は、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的とするよう用いられる。そのようなRNAの非限定的例には、メッセンジャーRNA(mRNA)，標的遺伝子の選択的RNAスライシング変種、標的遺伝子の転写後修飾RNA，標的遺伝子のフレームRNA、および/またはRNAテンプレートが含まれる。選択的スライシングにより、適当なエクソンの使用により区別される転写産物のファミリーが生ずる場合には、本発明は、適当なエクソンにより遺伝子発現を阻害して、遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するかまたはその間を区別するために用いることができる。例えば、選択的スライシングされた遺伝子ドメインを含む蛋白質を、腰結合型および分泌型の両方の形で発現させることができる。本発明を用いて遺伝子ドメインを含むエクソンを標的とすることができる。分泌型の蛋白質に対して、腰結合型の薬学的ターゲティングの機能的重要性を判定することができる。これらのRNA分子を標的とするごとに適応する本発明の非限定的例には、治療的医薬用途、医薬の発見用途、分子診断および遺伝子機器用途、および遺伝子マッピング、例えば本発明のs₁NA分子を用いる單一ヌクレオチド多型のマッピングが含まれる。そのような用途は、既知の遺伝子配列を用いて、または発現配列タグ(EST)から入手可能な部分配列から実行することができる。

【0121】

別の態様においては、本発明のs₁NA分子は、遺伝子ファミリー、例えばHIVファミリー遺伝子に対応する保存配列を標的とするために用いられる。そのように、多くのHIV標的を標的とするs₁NA分子は、増加した治療効果を提供することができる。さらには、s₁NAは、種々の応用法において遺伝子機能の経路を特性決定するために用いることができる。例えば、本発明を用いて、経路における標的遺伝子の活性を阻害して、遺伝子機能分析、mRNA機能分析、または翻訳分析において、特性決定されていない遺伝子の機能を決定することができる。本発明は、医薬開発に向けて、種々の疾患および健康状態に観察する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は、例えは、癌の進行および/または維持に関与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

【0122】

1つの態様においては、本発明のs₁NA分子および/または方法は、Genbank受託番号で表されるRNAをコードする遺伝子、例えば、本明細書においてGenbank受託番号(例えは本明細書に開示されるGenbank受託番号)で表されるRNA配列をコードするHIV遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

【0123】

1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複雑性を有するs₁NAコンストラクトのライブリを生成し、そして(b) 標的RNA配列中のRNAi標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のs₁NAコンストラクトをアッセイする、ことを含む方法を特徴とする。別の態様においては、(a)のs₁NA分子は、固定された長さ、例えは、約2.3ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a)のs₁NA分子は、異なる長さのものであり、例えは、約1.9-約2.5(例えは、約1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、または2.5)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。

1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビオRNAアッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、標的RNAのフラグメントを、例えは、ゲル電気泳動、ノザンプロット分析、またはRNAse保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的RNA配列は、当該技術分野において知られるように、例えは、

クローニングおよび/またはインビトロ系については転写、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0124】 1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複雑性、例えば⁴ (Nは、

s i N A コンストラクトの鎖のそれそれにおいて塩基対形成した又クレオチドの数を示す、例えば、19塩基対を有する21ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有するs i N A コンストラクトのライブライを生成し；そして(b) 標的H I V RNA配列中のRNA i 標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のs i N A コンストラクトをアッセイする、の各工程を含む方法を特徴とする。別の態様においては、(a) s i N A 分子は、固定された長さ、例えば約2.3ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a)のs i N A 分子は異なる長さのものであり、例えば、約1.9-2.0、2.1-2.2、2.4、または2.5 (例えは、約1.9、2.0、2.1、2.2、2.4、または2.5) ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書の実施例7に記載されるような、再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、H I V RNAのフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノサンプロット分析、またはRNAse保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的H I V RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的H I V RNA配列は、当該技術分野において知られるように、例えは、クローニングおよび/またはインビトロ系については転写により、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0125】

別の態様においては、本発明は、(a) 標的遺伝子によりコードされるRNA標的の配列を分析し；(b) (a)のRNAの1またはそれ以上の領域に相補的な配列を有するRNAまたはそれ以上のs i N A 分子の組を合成し；そして(c) 標的RNA配列中のRNA i 標的部位を決定するのに適した条件下で(b)のs i N A 分子はアッセイする、の各工程を含む方法を特徴とする。1つの態様においては、(b)のs i N A 分子は、固定された長さ、例えば約2.3ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては、(b)のs i N A 分子は、異なる長さ、例えは、約1.9-約2.5 (例えは、約1.9、2.0、2.1、2.2、2.4、または2.5) ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含んでいてもよい。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現している細胞培養系を含むことができる。標的RNAのフラグメントを、検出可能なレベルの切断について分析して、標的RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的RNA配列は、当該技術分野において知られるようにして、例えは、クローニングおよび/またはインビトロ系について転写により、インビトロ系においては発現により、得ることができる。

【0126】

“標的部位”とは、アンチセンス領域中に標的配列に相補的な配列を含むs i N A コンストラクトにより媒介される切断の“標的とされる”、標的RNA中の配列を意味する。

【0127】 “検出可能なレベルの切断”とは、標的RNAのランダム分解から生成するRNAのバッカグラウンドから切断物を識別するのに十分な程度の標的RNAの切断 (および切断産物RNAの形成) を意味する。ほとんどの検出方法について、標的RNAの1-5%から切断産物が生成すれば、バックグラウンドから検出するのに充分である。

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A 分子を薬学的に許容しうる組体または希釈剤中に含む組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A 分子を含有する細胞はヒト細胞である。さらには別の態様においては、本発明のs i N A 分子を含有する細胞はヒト細胞である。

本発明のs i N A 分子を薬学的に許容しうる組体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、被験者において疾患または健康状態を治療または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における疾患または健康状態の治療または予防に適した条件下で、被験者に本発明の組成物を単独または1またはそれ以上の他の治療用化合物と併用して投与することを含む。さらに別の態様においては、本発明は、被験者において組織活性を低減または予防に適した条件下で被験者に本発明の組成物を投与することを含む。

【0129】

別の態様においては、本発明は、H I V 遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方はH I V 標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 細胞、組織、または生物においてH I V 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を細胞組織、または生物に導入し；そして(c) 細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0130】

別の態様においては、本発明は、H I V 標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、s i N A 鎖の一方はH I V 標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 細胞、組織、または生物においてH I V 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を生物学的システムに導入し；そして(c) 生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0131】

“生物学的システム”とは、生物起源、例えは、限定されないが、ヒト、動物、植物、昆蟲、細菌、ウイルスまたは他の起源からの、精製されたまたは精製されていない形態の生物の用語には、例えば、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物が含まれる。生物学的システムとの用語にはまた、インビトロの設定で用いることができる再構成されたRNA i 系が含まれる。

【0132】

“表現型変化”とは、本発明の核酸分子 (例えはs i N A) との接触または処理に応答して生ずる任意の検出可能な細胞の変化を意味する。そのような検出可能な変化には、限定されないが、形状、サイズ、増殖、運動性、蛋白質発現またはRNA発現、または当該技術分野において知られる方法によりアッセイすることができる他の物理的または化学的变化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質 (G F P) のレポート遺伝子/分子、または発現された蛋白質を同定するために用いられる種々のタグ、またはアッセイすることができる任意の他の細胞成分の発現が含まれる。

【0133】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物におけるH I V 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上のH I V 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。

【0134】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の1またはそれ以上のs i N A 分子を含有する細胞を特徴とする。別の態様においては、本発明のs i N A 分子を含有する細胞は哺乳動物細胞である。さらには別の態様においては、本発明のs i N A 分子を含有する細胞はヒト細胞である。

【0135】

る1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0146】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNA_iを媒介するsiNAコンストラクトは、siNAコンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的DNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載された

1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0147】

別の態様においては、本発明は、siNA分子のアンチセンス鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0148】

(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b) siNA分子のアンチセンス鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているsiNA分子を同定するのに適した条件下で工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

別の態様においては、本発明は、siNA分子のアンチセンス鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0149】

(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b) siNA分子のアンチセンス鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0150】

別の態様においては、本発明は、化学生物学的に修飾されたsiNA分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性siNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0151】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNA_iを媒介するsiNAコンストラクトを特徴とし、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)化学生物学的に修飾されたsiNA分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性siNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0152】

別の態様においては、本発明は、HIVに対するRNA_iを媒介する化学生物学的に修飾されたsiNA分子、DNA分子および/または蛋白質またはRNA_iに必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

【0153】

別の態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0154】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、

【0155】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)標的DNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0156】

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、HIVに対するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良された細胞取り込みを有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0157】

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、HIVに対するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良された細胞取り込みを有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0158】

1つの態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)コンジュゲートをsiNA分子の構造中に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイすることを含む。そのようなコンジュゲートには、細胞セレクターのリガンド、例えば、天然に生ずる蛋白質リガンドなどに由来するペプチド；蛋白質尾在化配列、例えば細胞Z-1コード配列；抗体；核酸アブダマー；ビタミンおよび他の補因子、例えば葉酸およびN-アセチルガラクトースアミン；ポリマー、例えばポリエチレンジリコール(PEG)；リン脂質；ポリアミン、例えばスペルミン、またはスペルミジン；および他のものが含まれる。

【0159】

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)賦形剤処方をsiNA分子導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイすることを含む。そのような賦形剤には、ポリマー、例えばシクロキストリン、脂質、カチオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、およびその他のものが含まれる。

【0160】

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良された

いずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)標的RNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0161】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0162】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0163】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0164】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0165】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0166】

1つの態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0167】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0168】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0169】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0170】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0171】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0172】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0173】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

【0174】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するスクレオチドをsiNA分子導入し、そして(b)改良されたRNA_i活性を有するsiNA分子をアッセイする、ことを含む。

生物利用性を有する siNA 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

【0161】

別の領域においては、本発明の siNA 化合物にボリエチレングリコール (PEG) を共有結合的に結合させることができ。結合した PEG は、任意の分子量のものであつてよく、好ましくは約 2,000-約 50,000 ダルトン (Da) である。

【0162】

本発明は、单独で、またはインピトロまたはインピボで RNA を試験サンプルおよび/または被験者に導入するのに必要な試薬の少なくとも 1 つを有するキットの成分として、用いることができる。例えば、キットの好ましい成分には、本発明の siNA 分子、および本明細書に記載されるような、目的とする細胞内への siNA の導入を促進するベビックルが含まれる (例えば、脂質および当該技術分野において知られる他のトランسفェクション法を用いる。例えば、Beigelman et al.、米国特許 6,395,713 を参照)。キットは、例えば、遺伝子機能および/または活性の決定において標的評価のために、または薬剤最適化において、および薬剤の発見において用いることができる (例えば、Usman et al.、米国特許出願 60/402,996 を参照)。そのようなキットはまた、キットのユーザが本発明を実施できるようにするための指針を含んでよい。

【0163】

本明細書において用いる場合、"短干渉核酸"、"siNA"、"短干渉 RNA"、"siRNA"、"短干渉核酸分子"、"短干渉オリゴヌクレオチド分子"、または"化学的に修飾された短干渉核酸分子"の用語は、例えば、配列特異的模式で RNA 干渉 ("RNAi") または遺伝子サイレンシングを媒介することにより遺伝子発現またはウイルス複製をダウングリューレートする任意の核糖分子を表す (例えば、Bass, 2001, *Nature* 411, 428-429; Ebashir et al., 2001, *Nature* 411, 494-498; および Kreutzer et al., 国際公開 WO 00/3646; Fire, 国際公開 WO 00/44895; Zernicka-Goetz et al., 国際公開 WO 01/29058; Deschamps-Desaillette, 国際公開 WO 00/44914; Alishir, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, *Science*, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, *Science*, 297, 2232-2237; Huttvagner and Zamore, 2002, *Science*, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, *RNA*, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, *Gene & Dev.*, 16, 1616-1626; および Reinhart & Bartel, 2002, *Science*, 297, 1831 を参照)。本発明の siNA 分子の非限定的例は、図 4-6 および本明細書の表 I, II および IV に示される。例えば、siNA は、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖または二本鎖構造を形成し、例えば、アンチセンス鎖とがデュアルレックスまたは二本鎖構造を形成し、例えば、二本鎖領域は約 1.9 基対である)；アンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一

部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、siNA は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、siNA の自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。siNA は、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するボリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。siNA は 2 またはそれ以上のループ構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有する。siNA は 2 またはそれ以上のループ構造またはヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、環状ボリヌクレオチドは、インピボまたはインピトロでプロセシングされて、RNAi を媒介しそうな活性な siNA 分子を生み出される。siNA はまた、標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ボリヌクレオチドを含んでいてもよく、例えば、そのような siNA 分子が siNA 分子中に標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列の存在を必要としない場合)。ここで、一本鎖ボリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば 5'-リン酸 (例えば、Martinez et al., 2002, *Cell*, 110, 563-574 および Schwartz et al., 2002, *Molecular Cell*, 10, 537-558 を参照)、または 5', 3'-二リン酸を含んでいてもよい。ある態様においては、本発明の siNA 分子は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含んでいてもよく、センスおよびアンチセンス領域は、当該技術分野において知られるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカーフィンデルワールス相互作用、水素結合作用、および/またはスタッキング相互作用により非共有結合的に結合している。ある態様においては、本発明の siNA 分子またはそのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の siNA 分子は、標的遺伝子の発現の阻害が引き起こされるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相応する。本明細書において用いる場合、siNA 分子は RNA のみを含む分子に限定される必要はない、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも含む。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は 2'-ヒドロキシ (2'-OH) 含有ヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、RNAi を媒介するため 2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド (例えば、2'-OH 基を有するヌクレオチド) を含まなくてよい。しかし、RNAi を支持するために siNA 分子中にリボヌクレオチドの存在が必要としないそのような siNA 分子は、2'-OH 基を有する 1 またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したがんばーまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、siNA 分子は、ヌクレオチド位置の約 5, 10, 20, 30, 40, または 50 % にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子はまた、短干渉修飾オリゴヌクレオチド "siMON" と称される。本明細書において用いる場合、siNA との用語は、配列特異的 RNAi を媒介する核酸分子を記述するため用いらる他の用語、短干渉 RNA (siRNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、短ヘアピン RNA (shRNA)、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された siRNA、転写後遺伝子サイレンシング RNA (ptgsRNA)、および他のものと同等であることを意味する。さらに、本明細書において用いる場合、RNAi との用語は、配列特異的 RNA 干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後遺伝学 (c pi g n o t i c s) と同等であることを意味する。例えば、本発明の siNA 分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子をサイレンシングされることができる。非限定的例においては、本発明の siNA 分子による遺伝子発現の後

成的制御は、クロマチン構造の s i N A 緩介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる（例えば、A l l s h i r e, 2002, S c i e n c e, 297, 181-1819; V o l p e et al., 2002, S c i e n c e, 297, 183-1837; J e n u w e i n, 2002, S c i e n c e, 297, 2232-2237 を参照）。

【0164】“調節する”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされることを意味する。例えば、“調節する”との用語は、“阻害することを意味するが、“調節する”との用語の使用はこの定義には限定されない。

【0165】“阻害する”、“ダウンレギュレートする”、または“減少させる”とは、遺伝子の発現をコードするRNA分子または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子（例えばs i N A）の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの標識においては、s i N A分子による阻害、ダウンレギュレーションまたは低下は、不活性または微弱化分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の標識においては、s i N A分子による阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、例えば、スクランブル化配列を有するかミスマッチを有するs i N A分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の標識においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

【0166】“遺伝子”または“標的遺伝子”とは、RNAをコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ボリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランシスジョン、または外来遺伝子、例えば、病原体（例えばウイルス）の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含有する細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれうる。植物の非限定的例には、单子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0167】本明細書において用いる場合、“H I V”とは、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)感染

および後天性免疫不全症候群(A I D S)の進行、発達、または維持に関与する任意のウイルス、蛋白質、ペプチド、ボリペプチド、および/またはボリヌクレオチドを意味し、H I V遺伝子から発現されるもの、またはH I V感染に関与するもの（例えば、本明細書においてG e n b a n k 受託番号で参照されるボリヌクレオチドまたはH I V遺伝子に由来する他の任意のH I V転写産物）を含み、例えば、ウイルス全体、例えば、H I V-1, H I V-2, F I V-1, S I V-1；ウイルス成分、例えば、n e s, v i f, l a t, またはr e vウイルス遺伝子産物；およびH I V感染に関与する細胞標的が含まれる。

【0168】“H I V蛋白質”とは、任意のH I Vペプチドまたは蛋白質またはそれらの成分を意味し、ここで、ペプチドまたは蛋白質は、H I V遺伝子によりコードされるか、またはH I V活性を有する。

【0169】“高度に保存された配列領域”とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオ

チド配列が、1つの世代と他の世代とで、または1つの生物学的システムと他の生物学的システムとで有意に相違しないことを意味する。

【0170】“アンチセンス領域”とは、s i N A分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、s i N A分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、s i N A分子のセンス領域は、標的核酸配列とボロジーを有する核酸配列を含むことができる。

【0171】“アンチセンス領域”とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、s i N A分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、s i N A分子のアンチセンス領域は、s i N A分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0172】“標的核酸”とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸はD N AまたはR N Aでありうる。

【0173】“相補性”とは、核酸が、伝統的なワトソン-ク里ックまたは他の非伝統的なタイプのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に関する、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーの適切な機関、例えば、R N A-I 活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている（例えば、Turner et al., 1987, C S H Symp. Quant. Biol. L I I I p p. 123-133; F r i e r e t a l., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 83: 9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785を参照）。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン-ク里ック塩基対形成）を形成しうる連続する塩基のパーセンテージを示す（例えば、10塩基中の5, 6, 7, 8, 9, 10塩基は、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, および100%の相補性である）。“完全な相補性”とは、核酸配列の連続する塩基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する塩基と水素結合するであることを意味する。

【0174】

本発明のs i N A分子は、単独または他の治療法と組み合わせて、種々の病原性適応症または他の病気、例えば、H I V感染または後天性免疫不全症候群(A I D S)、および細胞または組織におけるH I Vのレベルに関与する他の任意の疾病または病気を治療するための新規な治療方法である。H I V発現（特にH I V R N Aレベル）の減少、したがって、それそれの蛋白質のレベルの減少は、疾患または病気の症状をある程度軽減する。

【0175】

本発明の1つの標識においては、本発明のs i N A分子の各配列は、独立して、約18-24ヌクレオチドの長さであり、特定の標識においては、約18, 19, 20, 21-22, 23、または24ヌクレオチドの長さである。別の標識においては、本発明のs i N Aデューブレックスは、独立して、約17-約23（例えば、約17, 18, 19, 20, 21, 22または23）塩基対を含む。さらに別の標識においては、ヘアピンまたは5, 5または5-5ヌクレオチドの長さであるか、または約3.8-約4.4（例えば、3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3または4.4）ヌクレオチドの長さであり、約1.6-約2.2（例えば、約1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1または2.2）塩基対を含む。本発明の例示的s i N A分子は本明細書に開示される。本発明の例示的合成s i N A分子は、表I I IおよびIV、および/または図4-5に示される。

【0176】本明細書において用いる場合、“細胞”は、その通常の生物学的意味で用いられ、多細胞生物全体を指さず、特にヒトを指さない。細胞は生物中で、例えば、鳥類、植物および哺

育度に保存された配列領域”とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオチド配列をコードする。

成的制御は、クロマチン構造のs i N A緩介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる（例えば、A l l s h i r e, 2002, S c i e n c e, 297, 181-1819; V o l p e et al., 2002, S c i e n c e, 297, 183-1837; J e n u w e i n, 2002, S c i e n c e, 297, 2232-2237 を参照）。

【0164】“調節する”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされることを意味する。例えば、“調節する”との用語は、“阻害することを意味するが、“調節する”との用語の使用はこの定義には限定されない。

【0165】“阻害する”、“ダウンレギュレートする”、または“減少させる”とは、遺伝子の発現をコードするRNA分子または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子（例えばs i N A）の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの標識においては、s i N A分子による阻害、ダウンレギュレーションまたは低下は、不活性または微弱化分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の標識においては、s i N A分子による阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、例えば、スクランブル化配列を有するかミスマッチを有するs i N A分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の標識においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

【0166】“遺伝子”または“標的遺伝子”とは、RNAをコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ボリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランシスジョン、または外来遺伝子、例えば、病原体（例えばウイルス）の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含有する細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれうる。植物の非限定的例には、单子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0167】本発明において用いる場合、“H I V”とは、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)感染

および後天性免疫不全症候群(A I D S)の進行、発達、または維持に関与する任意のウイルス、蛋白質、ペプチド、ボリペプチド、および/またはボリヌクレオチドを意味し、H I V遺伝子から発現されるもの、またはH I V感染に関与するもの（例えば、本明細書においてG e n b a n k 受託番号で参照されるボリヌクレオチドまたはH I V遺伝子に由来する他の任意のH I V転写産物）を含み、例えば、ウイルス全体、例えば、H I V-1, H I V-2, F I V-1, S I V-1；ウイルス成分、例えば、n e s, v i f, l a t, またはr e vウイルス遺伝子産物；およびH I V感染に関与する細胞標的が含まれる。

【0168】“H I V蛋白質”とは、任意のH I Vペプチドまたは蛋白質またはそれらの成分を意味し、ここで、ペプチドまたは蛋白質は、H I V遺伝子によりコードされるか、またはH I V活性を有する。

【0169】“高度に保存された配列領域”とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオチド配列をコードする。

【0170】

本発明のs i N A分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、s i N A分子のセンス領域は、標的核酸配列とボロジーを有する核酸配列を含むことができる。

【0171】“アンチセンス領域”とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、s i N A分子のアンチセンス領域は、s i N A分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0172】“標的核酸”とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸はD N AまたはR N Aでありうる。

【0173】“相補性”とは、核酸が、伝統的なワトソン-ク里ックまたは他の非伝統的なタイプのい

ずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子

に関する、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている（例えば、Turner et al., 1987, C S H Symp. Quant. Biol. L I I I p p. 123-133; F r i e r e t a l., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 83: 9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785を参照）。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン-ク里ック塩基対形成）を形成しうる連続する塩基のパーセンテージを示す（例えば、10塩基中の5, 6, 7, 8, 9, 10塩基は、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, および100%の相補性である）。“完全な相補性”とは、核酸配列の連続する塩基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する塩基と水素結合するであることを意味する。

【0174】

本発明のs i N A分子は、単独または他の治療法と組み合わせて、種々の病原性適応

症または他の病気、例えば、H I V感染または後天性免疫不全症候群(A I D S)、およ

び細胞または組織におけるH I Vのレベルに関与する他の任意の疾病または病気を治癒す

るための新規な治療方法である。H I V発現（特にH I V R N Aレベル）の減少、したが

って、それそれの蛋白質のレベルの減少は、疾患または病気の症状をある程度軽減する

。【0175】

本発明の1つの標識においては、本発明のs i N A分子の各配列は、独立して、約18-24ヌクレオチドの長さであり、特定の標識においては、約18, 19, 20, 21-22, 23、または24ヌクレオチドの長さである。別の標識においては、本発明のs i N Aデューブレックスは、独立して、約17-約23（例えば、約17, 18, 19, 20, 21, 22または23）塩基対を含む。さらに別の標識においては、ヘアピンまたは5, 5または5-5ヌクレオチドの長さであるか、または約3.8-約4.4（例えば、3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3または4.4）ヌクレオチドの長さであり、約1.6-約2.2（例えば、約1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1または2.2）塩基対を含む。本発明の例示的s i N A分子は本明細書に開示される。本発明の例示的合成s i N A分子は、表I I IおよびIV、および/または図4-5に示される。

【0176】本明細書において用いる場合、“細胞”は、その通常の生物学的意味で用いられ、多細胞生物全体を指さず、特にヒトを指さない。細胞は生物中で、例えば、鳥類、植物および哺

乳動物、例えばヒト、ウシ、ヤギ、無尾サル、有尾サル、アタ、イヌおよびネコ中で存在することができる。細胞は、原核生物（例えば細菌細胞）または真核生物（例えば哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は体細胞起源でも生殖細胞系起源でもよく、全能細胞でも多能性細胞でもよく、分裂していても分裂していないくともよい。細胞はまた、配偶子または胚、幹細胞、または完全に分化した細胞に由来するか、またはこれらを含むものであってもよい。

【017-7】

本発明のs i N A分子は、直接加えてもよく、またはカチオン性脂質と複合化して、リボソーム中に封入して、または他の方法により、標的細胞または組織にデリバリーすることができる。核糖体または核糖複合体は、関連する組織にエクスピード、または注射、注入ボンブまたはステンプを用いてインピボで、バイオボリマー中に取り込まれてまたは取り込まれず、局所的に投与することができる。特定の標的においては、本発明の核糖分子は表I-1-1-11および/または図4-5に示される配列を含む。そのような核糖分子の例は、これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに、表IVに記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意のs i N A配列に適用することができる。

【017-8】

別の観点においては、本発明は本発明の1またはそれ以上のs i N A分子を含む哺乳動物細胞を提供する。1またはそれ以上のs i N A分子は、独立して、同じまたは異なる部位を標的と提供する。

【017-9】

“RNA”とは、少なくとも1つのリボヌクレオチド構造を含む分子を意味する。“リボヌクレオチド”とは、 β -D-リボフuranース成分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA、例えば部分的に生成されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換的に製造されたRNA、ならびに1またはそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変更により天然に生ずるRNAと異なるよう変更されたRNAを含む。そのような変更は、非ヌクレオチド物質の付加、例えば、s i N Aの末端または内部（例えばRNAの少なくとも1またはそれ以上のヌクレオチド）への付加を含むことができる。本発明のRNA分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド、例えば、天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更されたRNAは、類似体または天然に生ずるRNAの類似体と称することができる。

【018-1】

“被験者”とは、外植された細胞のドナーまたはレシピエントである生物または細胞それ自身を意味する。“被験者”とはまた、本発明の核酸分子を投与することができる生物を表す。1つの標的においては、被験者は哺乳動物または細胞である。別の標的においては、被験者はヒトまたはヒト細胞である。

【018-1】

本明細書において用いる場合、“ホスホロチオエート”との用語は、式I（式中、ZおよびWはイオウ原子を含む）を有するヌクレオチド間結合を表す。したがって、ホスホロチオエートとの用語は、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

【018-2】

本明細書において用いる場合、“万能塩基”との用語は、天然のDNA/RNA塩基のそれぞれと、これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように（例えば、L0 acids, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447を参照）、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族基、イノシン、アゾルカルボキサミド、およびニトロアゾル基等、例えば、3-ニトロヒドロ、

4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールが挙げられる。

【018-3】

本明細書において用いる場合、“非環状ヌクレオチド”との用語は、“非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えば、リボース炭素（C1, C2, C3, C4、またはC5）のいずれかが、独立してまたは組み合わせてヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを表す。

【018-4】

本発明の核糖分子は、個別に、または他の薬剤と組み合わせてまたは一緒に、本明細書に記載される疾患または状態（例えば癌および他の増悪性疾患）を治療するために用いることができる。例えば、特定の疾患または状態を治療するために、治療に適した条件下でs i N A分子を個別にまたは1またはそれ以上の薬剤と組み合わせて被験者に投与することができ、または当該者には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

【018-5】

さらに別の標的においては、s i N A分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を1またはそれ以上の既知の治療剤と組み合わせて用いて、疾病または健康状態を治療することができる。本発明のs i N A分子と容易に組み合わせることができる他の治療剤の非限定的例は、酵素的核糖分子、アロステリック核糖分子、アンチセシス、テコイ、またはアブタマー核糖分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、端およびイオンである。

【018-6】

1つの標的においては、本発明は、本発明の少なくとも1つのs i N A分子をコードする核糖配列を、そのs i N A分子の発現を可能とするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デュープレックスを含むs i N A分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしがつてs i N A分子を形成する1つの核糖分子をコードする配列を含むことができる。そのような発現ベクターの非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500;およびNovina et al., 2002, Nature Medicine, 8, 681-686に記載されている。

【018-7】

別の標的においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

【018-8】

さらに別の標的においては、本発明の発現ベクターは、Genbank受託番号で表されるRNA分子に対する相補性を有するs i N A分子の配列を含む。

【018-9】

1つの標的においては、本発明の発現ベクターは、2またはそれ以上のs i N A分子をコードする核糖配列を含み、これらは同じであっても異なっていてもよい。

【019-0】

本発明の別の観点においては、標的RNA分子と相互作用して、標的RNA分子（例えば、本明細書においてGenbank受託番号で表される標的RNA分子）をコードする遺伝子をダウンリギュレートするs i N A分子は、DNAまたはRNAベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNAプラスミドまたはウイルスベクターでありうる。s i N Aを発現するウイルスベクターは、限界されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスに基づいて

10
40
30
20
10
50

構築することができる。s i N A 分子を発現しうる組換えベクターは、本明細書に記載されるようにデリバリーされ、標的細胞中に残留する。あるいは、s i N A 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、s i N A 分子は結合して R N A 干渉 (R N A i) により遺伝子機能または発現をダウンレギュレートする。s i N A を発現するベクターのデリバリーは、全身的（例えば、静脈内または筋肉内投与により）、被験者から外被された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所の標的細胞中への導入を可能とする他のいすれかの手段によりを行うことができる。

【0191】

“ベクター”とは、所望の核酸をデリバリーするために用いられる、任意の核酸および/またはウイルスに基づく手法を意味する。

【0192】 本発明の特徴および利点は、以下の本発明の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0193】

図 1 は、s i N A 分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的 s i N A 配列鎖である鎖 1 および鎖 2 をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスクレオチドまたは無塩基スクレオチドで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリソソマーと同じであっても差はない。合成は固相でも液相でもよく、示される例においては合成は固相合成である。合成は、タンデムモリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチド上にジメトキシトリチル基等の保護基が残るよう実施する。オリゴヌクレオチドを切断および脱保護すると、2 つの s i N A 鎮は自発的にハイブリダイズして s i N A デュープレックスを形成するため、末端保護基の性質を利用してデュープレックスを精製することができる。これは、例えば、末端保護基を有するデュープレックス/オリゴヌクレオチドのみが単離されるトリチルオノ精製法を適用することにより行うことができる。

【0194】

図 2 は、本発明の方法により合成された標的 s i N A デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。示される 2 つのビーカーは、別々の s i N A 配列鎖の推定質量に対応する。この結果は、タンデム合成から生成された s i N A デュープレックスを、単純なトリチルオノ精製方法論を用いて单一物質として精製しうることを示す。

【0195】

図 3 は、R N A i に関する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの非限定的例を示す図である。外來一本鎖 R N A、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性 R N A から R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ (R d R P) により生成される二本鎖 R N A (ds R N A) が、ダイサー (D I C E R) 酶を活性化し、次にこれは s i N A デュープレックスを生成する。あるいは、合成または発現された s i N A を適当な手段により細胞内に直接導入することができる。活性な s i N A 槍合体が形成され、これは標的 R N A を認識し、その結果、R I S C エンドヌクレオアーゼ複合体により標的 R N A が分解されるか、または R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ (R d R P) により追加の R N A が合成され、これはダイサーを活性化して追加の s i N A 分子が生じ、このことにより R N A i 応答が増幅される。

【0196】

図 4 A-F は、本発明の化学的修飾された s i N A コンストラクトの非限定的例を示す。図中、N は任意のヌクレオチド（アデノシン、グアニン、シトシン、ウリジン、または任意にチミジン）を表し、例えば、括弧 (N) により表されるオーバーハング領域においてチミジンで置換されていてもよい。s i N A コンストラクトのセンス鎖およびアンチセンス鎖について種々の修飾が示されている。

【0197】 図 4 B : センス鎖は、2'ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは、任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのビリミジンヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-メチルまたは 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドで、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 2'ヌクレオチドを含み、任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対間に相補的であってもよく、1 個の 3' 末端ホスホロヌクレオチドまたは 4 個の 5' 末端ホスホロヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのビリミジンヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0198】

図 4 C : センス鎖は 2'ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは、任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのビリミジンヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-メチルまたは 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドで、これはリボヌクレオチド、任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドを含み、任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対間に相補的であってもよく、1 個の 3' 末端ホスホロヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0199】

図 4 C : センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 2'ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく、存在しうるすべてのビリミジンヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-メチルまたは 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドで、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は、2'ヌクレオチドを含み、任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対間に相補的であってもよく、1 個の 3' 末端ホスホロヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0200】

図 4 D : センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 2'ヌクレオチドを含み、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのビリミジンヌクレオチドは (N N) ヌクレオチドを除き 2' -O-デオキシヌクレオチド、2' -フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 2'ヌクレオチドを含み、これは任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2 個の末端 3' -ヌクレオチドは任意に塩基対間に相補的であってもよく、1 個の 3' 末端ホスホロヌクレオチドまたは 4 個の 5' 末端ホスホロヌクレオチドで、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

・O-メチル修飾又クレオチドであり、これはリボヌクレオチド、テオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0201】
図4E：センス鎖は5'末端キャップ成分および3'末端キャップ成分を有する2'1ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在するすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'、-デオキシー2'、-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、テオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は2'1ヌクレオチドを含み、任意に3'末端ダリセリル成分を有する。アントセンス鎖は2'1ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的でいてもよく、ここで、2個の末端3'、-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在するすべてのピリミジンヌクレオチドは2'、-デオキシー2'、-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在するすべてのプリンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'、-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、テオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0202】

図4F：センス鎖は5'末端キャップ成分および3'末端キャップ成分を有する2'1ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在するすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'、-デオキシー2'、-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、テオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は5'ヌクレオチドを含み、任意に3'末端ダリセリル成分を有する。アントセンス鎖は2'1ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、存在するすべてのピリミジンヌクレオチドは2'、-デオキシー2'、-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在するすべてのプリンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'、-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、テオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0203】
図5A-Fは、本発明の化学的に修飾された特定のs i N A配列および3'末端キャップ成分を有する2'1ヌクレオチドである。

A-Fは、図4A-Fに示される化学的修飾をH i V s i N A配列に適用したものである。

【0204】

図6は、本発明の種々のs i N Aコンストラクトの非限定的例を示す。示される例(コンストラクト1, 2, 3)は典型的な19塩基対を有するが、本発明の異なる様様には本明細書に記載される任意の数の塩基対が含まれる。括弧内の領域は、例えば約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは約2ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハンクを表す。コンストラクト1および2は、R N A活性用に独立して用いることができる。コンストラクト2は、ボリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンクを含むことができ、これは、任意に、生物分解性リンクとして設計することができる。1つの態様においては、コンストラクト2に示されるループ構造は生物分解性リンクを含むことができ、このことにより、インビトロおよび/またはインビトロでコンストラクト1が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト2を生成するためにコンストラクト3を用いることができ、ここで、リンクはインビトロおよび/またはインビトロで活性なs i N Aコンストラクト2を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リンクを用いてインビトロおよび/またはインビトロで活性なs i N Aコンストラクト1を生成することができる。そのように、s i N Aコンストラクトの安定性および/または活性は、インビトロまたはインビトロにおいて用いるた

めのs i N Aコンストラクトの設計に基づいて調節することができる。

【0205】
図7A-Cは、s i N Aヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

【0206】
図7A: 5'、-制限部位(R1)配列、次に予め決定されたH i V標的配列と同一の配列を有する領域(s i N Aのセンス領域)を含むようにDNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21、または22ヌクレオチド(DN)の長さを有し、その後に例えば約3-約10ヌクレオチドを含む規定された配列(X)のループ配列を有する。

【0207】
7B: 次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、H i V標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するs i N A転写産物が得られる。

【0208】
7C: コンストラクトを加熱(例えば約95°C)にして、配列を直鎖状とすることにより、第1の鎖の3'、-制限部位に対するプライマーを用いて相補的な第2鎖を伸長することができる。次に、二本鎖DNAを細胞における発現用の適当なベクター中に捕入する。コンストラクトは、例えば、制限部位を設計することにより、および/またはPaula(2002, Nature Biotech 11: 101-08Y, 29, 505-508)に記載されるようにポリU末端領域を利用することにより、転写により3'末端ヌクレオチドオーバーハンクが生ずるよう設計することができる。

【0209】
図8A-Cは、発現カセットを作製して二本鎖s i N Aコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。
【0210】
図8A: 5'、-制限(R1)部位配列、次に予め決定されたH i V標的配列と同一の配列を有する領域(s i N Aのセンス領域)を有するように、DNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21、または22ヌクレオチド(DN)の長さを含み、その後に規定された配列(X)のループ配列に隣接する3'、-制限部位(R2)を有する。

【0211】
図8B: 次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼで伸長させて、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成する。

【0212】
図8C: コンストラクトをR1およびR2に特異的な制限酵素で処理して二本鎖DNAを生成し、次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。U6プロモータ領域がd s DNAの両側を挟むように転写カセットを設計し、このことによりs i N Aの別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリT末端配列をコンストラクトに付加して、得られる転写産物中にUオーバーハンクを生成することができる。

【0213】
図9A-Eは、特定の標的核酸配列、例えはメッセンジャーRNA中のs i N A媒介性RNA i の標的部位を決定するために用いられる方法の概略図である。

【0214】
図9A: s i N Aコンストラクトのアンチセンス領域が標的の核酸配列の全域で標的の部位に対する相補性を有し、センス領域がs i N Aのアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう、s i N Aオリゴヌクレオチドのペールを合成する。

【0215】
図9BおよびC: 配列をペールし、ペクターの細胞中へのトランسفエクションにより

導されるRNA Iを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNA I活性を媒介するために必須であるs i RNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、2'-メチオレオチドのs i RNAデューブレックスは2つの2ヌクレオチド3'-末端ヌクレオチドオーバーハンプを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のs i RNA鎖を2'-デオキシまたは2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNA I活性が破壊されることが、3'-末端s i RNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは容認されることが示された。s i RNAデューブレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNA I活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、端的RNAにおける切断部位の位置はs i RNAガイド配列の3'末端により規定されることを示した(E. I. b a s h i r et al., 2001, E. M. B. O. J., 20, 6877)。他の研究は、s i RNAデューブレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がs i RNA活性に必要であり、s i RNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示したが(Nykanen et al., 2001, C e l l, 107, 309)、5'-リン酸を欠失したs i RNAは外的に導入したときに活性であり、このことは、インビボでs i RNAコンストラクトの5'-リン酸化が生じているかも知れないことを示唆する。

【0224】

核酸分子の合成

100ヌクレオチドを越える長さの核酸の合成は、自動化方法を用いては困難であり、そのような分子の治療コストは非常に高くなる。本発明においては、好ましくは、小さい核酸モチーフ ("小さい"とは、100ヌクレオチド以下の長さ、好ましくは50ヌクレオチド以下の長さ、最も好ましくは50ヌクレオチド以下の長さの核酸モチーフ、例えば、別々のs i RNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたs i RNA配列を表す) が外的デリバリーに用いられる。これらの分子は構造が簡單であるため、核酸が蛋白質および/またはRNA構造の簡約領域に進入する能力が高い。本発明の例示的分子は化学的に合成するが、他の分子も同様に合成することができる。

【0225】

オリゴヌクレオチド(例えば、ある種の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部)は、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Winchott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Winchott et al., 1997, Methods Mol. Biol., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnology 16, 61-345,およびBrennan, 米国特許6, 001, 311に記載される。当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する(これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する)。オリゴヌクレオチドの合成は、一般的の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5'-末端にジメトキシトリル基、および3'-末端にホスホアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スクエールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で、改変した0.2 μmoleスケールプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-O-メチルヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2 μmoleスケールでの合成は、96ウェルフレート合成機、例えば、Proteogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。ボリマー結合5'-ヒドロキシル基の各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシル基に対して3.3倍過剰(6.0 μLの0.11M=6.6 μmole)の2'-O-メチルホスホアミダイトおよび7.5倍過剰のS-エチルテトラゾール(6.0 μLの0.25M=1.5 μmole)を用いることができる。リボヌクレオチドにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシル基に対して6.6倍過剰(1.20 μLの0.11M=1.32 μmole)のアルキルシリル(リボ)保護ホスホアミダイトおよび1.5倍過剰のS-エチルテトラゾール(2.0 μLの0.25M=3.0 μmole)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル曲分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下とのおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチル

μmole)を用いることができる。デオキシリボヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシルに対して2.2倍過剰(4.0 μLの0.11M=4.4 μmole)のデオキシホスホアミダイトおよび7.0倍過剰のS-エチルテトラゾール(4.0 μLの0.25M=1.0 μmole)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル画分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下とのおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチル

【0226】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う: ポリマー結合トリチルオニ(リボ)ヌクレオチドを4mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、40%水性メチルアミン(1mL)の溶液中で65℃で10分間振盪する。-20℃で冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0mLのEtOH:MeCN:H₂O/3:1:1で3回洗浄し、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。

【0227】

本発明のある種のs i RNA分子を含むRNAについて用いられる合成方法は、Usman (1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringe et al. (1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433) およびWinchott (1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Winchott (1997, Methods Mol. Biol., 74, 59) に記載したがい、慣用の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5'-末端にジメトキシトリル基、および3'-末端にホスホアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スクエールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で、改変した0.2 μmoleスケールプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-O-メチルヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2 μmoleスケールでの合成は、96ウェルフレート合成機、例えば、Proteogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。

2', -O-メチルヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシル基に対して3.3倍過剰(6.0 μLの0.11M=6.6 μmole)の2'-O-メチルホスホアミダイトおよび7.5倍過剰のS-エチルテトラゾール(6.0 μLの0.25M=1.5 μmole)を用いることができる。リボヌクレオチドにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシル基に対して6.6倍過剰(1.20 μLの0.11M=1.32 μmole)のアルキルシリル(リボ)保護ホスホアミダイトおよび1.5倍過剰のS-エチルテトラゾール(2.0 μLの0.25M=3.0 μmole)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル曲分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下とのおりである: 脱トリチル化溶液は塩化メチル

ン中 3% TCA (A,B,I) であり; キャッピングは、THF 中 1.6% N-メチルイミダゾール (A,B,I) および THF 中 1.0% 無水酢酸 / 1.0% 2,6-二ルチルチジン (A,B,I) 中で行い; 脱化溶液は、THF 中 1.6, 9 mM I₂, 4.9 mM ピリジン, 9% 水 (P E R S E P T I V E (登録商標)) である。Bur d i c k & J a c k s o n 合成等級アセトトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中 0.2 M) は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホチオエート結合の導入のために、ボーケージ試薬 (3 H-1, 2-ヘンゾジオール-3-オノン 1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中 0.05 M) を用いる。

【0228】 RNA の脱保護は、2 ポットプロトコルまたは 1 ポットプロトコルのいずれかを用いて行う。2 ポットプロトコルについては、ポリマー結合トリチルオノリゴリボヌクレオチドを 4 mL のガラスねじ盤バイアルに移し、4.0% 水性メチルアルミン (1 mL) の溶液中で 6.5% で 10 分間懸濁する。-20℃ で冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を 1.0 mL の EtOH : MeCN : H₂O / 3 : 1 : 1 で 3 回洗浄し、ボルテックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水 TEA / HF / NMP 溶液 (1.5 mL N-メチルビロジノン, 7.50 μL TEA および 1.0 mL TEA · 3 HF の溶液 3.00 μL, HF 濃度 1, 4 M) に再懸濁し、6.5℃ で加熱する。1.5 時間後、オリゴマーを 1.5 M NH₄HCO₃ で反応を停止させる。

【0229】 あるいは、1 ポットプロトコルのために、ポリマー結合トリチルオノリゴリボヌクレオチドを 4 mL のガラスねじ盤バイアルに移し、3.3% エタノール性メチルアルミン / DMSO : 1 / 1 (0.8 mL) の溶液中で、6.5℃ で 15 分間懸濁する。バイアルを室温に保つ。TEA · 3 HF (0, 1 mL) を加え、バイアルを 6.5℃ で 15 分間加熱する。試料を -20℃ で冷却し、次に 1.5 M NH₄HCO₃ で反応を停止させる。

【0230】 トリチルオノリゴマーの精製のために、停止した NH₄HCO₃ 溶液を、アセトニトリルを 4 mL で 50 mM TEA A で予備洗浄した C-18 合成カラムに充填する。バイアルを室温で冷却したカートリッジを水で洗浄した後、RNA を 0.5% TFA で 13 分間脱トリチル化する。次にカートリッジを水で再び洗浄し、1 M NaCl で塩交換し、再び水で洗浄する。次に、3.0% アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

【0231】 平均段階カッティング収率は、典型的には >98% である (Win c o t t et a l., 1995 Nucleic Acids Res., 23, 2677-2684)。当業者は、合成のスケールは、上述の例より大きくまたは小さく、例えば、限定されないが、9.6 ヴェルのフォーマットに適合させることができること認識するであろう。

【0232】 あるいは、本発明の核酸分子は、別々に合成して、合成後に例えばライゲーションにより、3.0% アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

【0233】 本発明の別々の観点においては、本発明の siNA 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスマドまたはウイルスベクターであります。siNA を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし、標的細胞中に発留させることができる。あるいは、siNA 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。

【0234】 本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾 (塩基、糖および/またはリン酸) を有する化学的に合成した核酸分子は、血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができ、このことによりその抵抗力を高めることができ (例えば、Eckstein et al., 国際公開 WO 92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Piek et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開 WO 93/15187; Rossi et al., 国際公開 WO 91/03162; Sproat, 米国特許 5,334,711; Gold et al., US 6,300,074 および Bur g i n et al., (上掲) を参照 (これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および/または構成成分ならずの種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抵抗力を増強するよう修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するためには核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

【0235】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

により分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し、次にこれを切断して別々の siNA フラグメントまたは鎖を生成し、これはハイブリダイズして siNA テューブフレックスの構造を可能とする。リンカーはポリヌクレオチドリカーアットも非ヌクレオチドリカーアットもよい。本明細書に記載される siNA のタンデム合成は、マルチウェル / マルチウェルコット合成功能 (アセトニトリル中 0.2 M) は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホチオエート結合の導入のために、バッチアクリターラムなどを用いる大規模合成プラットフォームにも容易に適合させることができる。

【0236】 siNA 分子はまた、一方のフラグメントが RNA 分子のセンス領域を含み、第 2 のフラグメントがアンチセンス領域を含む 2 つの別々の核酸鎖またはフラグメントから組み立ててもよい。

【0237】 本発明の核酸分子は、広範囲に修飾して、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ-2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-H による修飾により安定性を高めることができ (概説として、Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163 を参照)。siNA コンストラクトは、一般的な方法を用いてゲル電気泳動により精製するか、または高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Win c o t t et al., (上掲) を参照、その全体を本明細書の一部としてここに引用する) により精製し、水に再懸濁する。

【0238】 本発明の別の観点においては、本発明の siNA 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスマドまたはウイルスベクターであります。siNA を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし、標的細胞中に発留させることができる。あるいは、siNA 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。

【0239】 修飾 (塩基、糖および/またはリン酸) を有する化学的に合成した核酸分子は、血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができ、このことによりその抵抗力を高めることができ (例えば、Eckstein et al., 国際公開 WO 92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Piek et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開 WO 93/15187; Rossi et al., 米国特許 5,334,711; Gold et al., US 6,300,074 および Bur g i n et al., (上掲) を参照 (これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および/または構成成分ならずの種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抵抗力を増強するよう修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するためには核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

【0240】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0241】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0242】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0243】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0244】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0245】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0246】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0247】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0248】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0249】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0250】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0251】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0252】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0253】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0254】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0255】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0256】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0257】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0258】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0259】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0260】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0261】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0262】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0263】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0264】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0265】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0266】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0267】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0268】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0269】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0270】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0271】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0272】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0273】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0274】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0275】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0276】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0277】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0278】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0279】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0280】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0281】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0282】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0283】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0284】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0285】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0286】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0287】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0288】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0289】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0290】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0291】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0292】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0293】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0294】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0295】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0296】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0297】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0298】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0299】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0300】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0301】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0302】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0303】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0304】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0305】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0306】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0307】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0308】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0309】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0310】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0311】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

【0312】 本発明の siNA 分子はまた、本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では、両方の siNA 鎮を、切断可能なリンカーションにより、一緒につなげてもよい。

2' - C - アリル, 2' - フルオロ, 2' - O - メチル, 2' - O - アリル, 2' - H 等の
ヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより, 安定性を高め, よりも/または生物学的活
性を増強するために修飾される(総説については, Usman and Cedergr
en, 1992, *Tit B S* 17, 34; Usman et al., 1994, *Nu
clic Acids Symp. Ser.* 31, 163; Burgin et al., 1996, *Biochemistry* 35, 14090 を参照)。核酸分子の糖修飾
は, 当該技術分野において広く記載されている(Eckstein et al., 国際
公開WO 92/07065; Perrault et al., *Nature* 1990, 314-317; Usman and Cedergr
en, 1992, 17, 334-339; Usman et al., 国際公開WO 93/15187; Sproat, 米国特許 5,334,711; Beig
elman et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO 97/26270; Beigelman et al., 米国特許 5,716,824; Usman et al., 米国特許 5,627,053; Woolf et al., 国際公開WO 98/13526; Thomp
son et al., 米国特許出願 6,0/082,404 (1998 年 4 月 20 日出願); Karpelisky et al., 1998, *Tetrahedron Lett.*, 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, *Bio
polymers (Nucleic Acid Sciences)*, 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, *Ann. Rev. Biochem.*, 67, 99-134; および Burlina et al., 1997, *Med. Chem.*, 5, 1999-2010 を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 酸塩活性を変更
することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定
する一般的な方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。この
ような表示の観点から, siNA が細胞において RNAi を促進する能力が有意に阻害され
ない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明の siNA 核酸分
子を修飾することができる。

【0239】

ホスホロジオエート, ホスホロジオエート, よりも/または 5' - メチルホスホネ
ト結合によるオリゴヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが
過剰な修飾はある種の毒性和活性の低下を引き起こす。したがって, 核酸分子
を設計する場合, これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。これらの結合
の濃度を減少させると, 毒性が低下し, これらの分子の効力が増加し特異性が高くなる
のである。

【0240】
活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干渉核酸(siNA)分子が提供され
る。そのような核酸はまた, 一般に非修飾核酸よりヌクレオチドに対する耐性が高い。し
たがって, インビトロおよび/またはインビトボで活性は顕著に低下しないはずである。調
節が目的である場合には, 外的にデリバリーされる治療用核酸分子は, 最適には, 皇
ましくない蛋白のレベルが低下するのに充分長い時間標的 RNA の翻訳が調節されるまで細
胞内で安定であるべきである。この時間は, 疾病の状態により数時間から数日まで様々で
ある。RNA およびDNA の化学合成における進歩(Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677; Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19 (本明細書の一部としてここに引用する))により, 上述のようにヌクレオチド修
飾を導入してそのヌクレオチド安定性を高めることにより, 核酸分子を改変する可能性が
拡大した。

【0241】

1 つの態様においては, 本発明の核酸分子は, 1 またはそれ以上(例えば, 約 1, 2,
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上の)G クランプヌクレオチドを含む
。G クランプヌクレオチドは, 修飾シトシン類似体であり, ここで, 修飾は, デュープレ
ックス中の相補的グアニンのウツン・クリックおよびフーグスティング面の両方の水素
結合の能力を有する。例えば, Lin and Matteucci, 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8531-8532 を参照。オリゴヌクレオチド中の
单一の G クランプ類似体置換により, 相補的オリゴヌクレオチドハイブリダイズしたと
きのらせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に增强することができる。そのよう
なヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核酸糖の相補的配列
またはヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核酸糖の相補的配列
またはテンブレーート鎖に対する親和性および特異性の両方が增强される。別の態様におい
ては, 本発明の核酸分子は 1 またはそれ以上(例えば, 約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,
8, 9, 10 個またはそれ以上の)の LN "ロック核酸" ヌクレオチド, 例えば, 2', 4
'-C メチレンビシクロヌクレオチドを含む(例えば, Wengel et al., 国
際公開WO 00/66604 および WO 99/14226 を参照)。

【0242】

別の態様においては, 本発明は, 本発明の siNA 分子のコンジュゲートおよび/または
複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲートおよび/または複合体は, 生物学的シ
ステム, 例えば細胞への siNA 分子のデリバリーを容易にするために用いることができる
。本発明により提供されるコンジュゲートおよび/または複合体は, 治療用化合物を細胞膜を超
えて輸送し, 薬物動態学を変更し, よりも/または本発明の核酸分子の局在化を調節する
ことにより, 治療的活性を付与することができる。本発明は, 分子, 例えば, 限定されな
いが, 小分子, 脂質, リン脂質, ヌクレオチド, 核酸, 抗体, ドキシン, 負に荷電したポリマー, オリエチレングリコール, またはポリアミンを, 細胞膜を横切ってデリバリーする
化合物, ポリエチレングリコール, またはポリアミンを, 細胞膜を横切ってデリバリーする。一般に, 記載さ
れたランプボーダーは, 個々にまたは多成分系の一部として, 分解性リソームを付
けたはなしで用いるよう設計される。これらの化合物は, 血清の存在下または非存在下で,
本発明の核酸分子を異なる組織に由来する多數の細胞タイプにデリバリーおよび/または
局在化することを改良すると予測される(Sullenger and Czech, 米国
特許 5,854,038 を参照)。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは, 生物
分解性のリソーム, 例えば生物分解性核酸リソーム分子を介して, 生物学的に活性な分子
に結合させることができる。

【0243】

本明細書において用いる場合, "生物分解性リソーム" との用語は, 1 つの分子を別の分
子にセンス鎖とアンチセンス鎖とを接続するための生物分解性リソームとして設計さ
れる核酸または非核糖リソーム分子を表す。生物分解性リソームは, 特定の目的, 例えば
特定の組織または細胞タイプへのデリバリーのためにその安定性を調節することができる
ように設計する。核糖に基づく生物分解性リソーム分子の安定性は, リボヌクレオチド,
デオキシリボヌクレオチド, および化学的に修飾されたヌクレオチド, 例えば, 2', -O
-メチル, 2' -フルオロ, 2' -アミノ, 2' -O -アミノ, 2' -C -アリル, 2' -
-O -アリル, および他の 2' -修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを
用いることにより調節することができる。生物分解性核糖リソーム分子は, ダイマー, ト
リマー, テトラマー, またはより長い核糖分子, 例えば, 約 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または 20 ヌク
レオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ, またはリソームに基づく結合, 例
えば, ホスホルミドまたはホスホジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含
むことができる。生物分解性核糖リソーム分子はまた, 核糖骨格, 核糖糖, または核糖塩
基修飾を含むことができる。

10

30

40

40

50

【0244】

本明細書において用いる場合, "生物分解性リソーム" との用語は, 1 つの分子を別の分
子にセンス鎖とアンチセンス鎖とを接続するための生物分解性リソームとして設計さ
れる核酸または非核糖リソーム分子を表す。生物分解性リソームは, 特定の目的, 例えば
特定の組織または細胞タイプへのデリバリーのためにその安定性を調節することができる
ように設計する。核糖に基づく生物分解性リソーム分子の安定性は, リボヌクレオチド,
デオキシリボヌクレオチド, および化学的に修飾されたヌクレオチド, 例えば, 2', -O
-メチル, 2' -フルオロ, 2' -アミノ, 2' -O -アミノ, 2' -C -アリル, 2' -
-O -アリル, および他の 2' -修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを
用いることにより調節することができる。生物分解性核糖リソーム分子は, ダイマー, ト
リマー, テトラマー, またはより長い核糖分子, 例えば, 約 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または 20 ヌク
レオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ, またはリソームに基づく結合, 例
えば, ホスホルミドまたはホスホジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含
むことができる。生物分解性核糖リソーム分子はまた, 核糖骨格, 核糖糖, または核糖塩
基修飾を含むことができる。

50

本明細書において用いいる場合、“生物分解性”との用語は、生物学的システムにおける分解、例えば酵素的分解または化学的分解を表す。

【0 2 4 5】

本明細書において用いいる場合、“生物学的に活性な分子”との用語は、システムにおいて生物学的応答または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性な s i N A 分子により単独または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性な s i N A 分子の非限定的例としては、治療上活性な分子、例えば、抗体、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、蛋白質、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸、アントセンス核酸、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、2', 5'-Aキメラ、s i N A、d s i N A、アロサイム、アブタマー、デコイ活性な分子の類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には、他の生物学的に活性な分子の薬物動態学および/または薬力学を調節することができる分子、例えば、脂質およびこれらの類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には、他の生物学的に活性な分子のリパーゼ、例えば、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレンゲリコールおよび他のポリエーテルも含まれる。

【0 2 4 6】

本明細書において用いいる場合、“リン脂質”との用語は、少なくとも1つのリン脂基を含む疎水性分子を表す。例えば、リン脂質は、リン酸含有基および飽和または不飽和アルキル基を含むことができ、これは、O H, C O O H, オキソ、アミン、または置換もしくは未置換アリール基で任意に置換されていてもよい。

【0 2 4 7】

A 転写産物のレベルが低下するのに充分長い時間 R N A の逆転写が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。核酸分子は、有効な細胞内治療用薬剤として機能するためには、ヌクレアーゼに耐性である。本明細書において記載される核酸分子の化学合成の改良により、上述したように、ヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレアーゼ安定性を増強させることにより、核酸分子を修飾する可能性が拡大した。

【0 2 4 8】

さらに別の態様においては、R N A に関する蛋白質の酵素活性を維持するかまたは増強させる化学的修飾を有する s i N A 分子が提供される。そのような核糖はまた、一般に非修飾核糖よりヌクレアーゼに対してより耐性が高い。したがって、インヒビトロおよび/またはインヒビトド、活性は頭著に低下しないであろう。

【0 2 4 9】

本発明の核糖系分子の使用は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾患の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子を標的とする多數の s i N A 分子、既知の小分子阻害剤とカップリングさせた核酸分子、または分子（異なる酵素的核酸分子モチーフを含む）および/または他の化学的または生物学的分子の組み合わせによる間欠的治療）。s i N A 分子を用いる被験者の治療にはまた、異なる種類の核糖系分子、例えば、酵素的核酸分子（リボザイム）、アロザイム、アントセンス、2', 5'-A オリゴアデニレート、デコイ、およびアブタマーの組み合わせが含まれる。

【0 2 5 0】

別の観点においては、本発明の s i N A 分子は、1またはそれ以上の5'および/または3'、-キャップ構造を、例えばセンス s i N A 鎮のみに、アントセンス s i N A 鎮のみに、または両方の s i N A 鎮に含む。

【0 2 5 1】

“キャップ”とは、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば、A d a m i c et al. , 米国特許5, 998, 203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。これらの末端修飾は、核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、デリバリーおよび/または細胞中の局在化を助けるであろう。キャップは5'末端（5'、-キャップ）に存在してもよく、または3'末端（3', -キャップ）に存在してもよい。非限定的例においては、

5' -キャップは、グリセリル、反転デオキシ無塩基（成分）；4', 5' -メチレンヌクレオチド；1' -（ベータ-D-エリスロフランシル）ヌクレオチド、4' -オキシヌクレオチド；脱酰基ヌクレオチド；L -ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩ヌクレオチド；非環状3', 4' -セコヌクレオチド；非環状3', 4' -ジヒドロキシヌクレオチド；非環状3', 5' -ジヒドロキシベンチルヌクレオチド；3', -3' -反転ヌクレオチド成分；3', -3' -反転無塩基成分；1, 4 -ブタンジオールヌクレオチド；3', -3' -反転ヌクレオチド成分；3', -2' -反転ヌクレオチド成分；3', -2' -反転無塩基成分；1, 4 -ブタンジオールヌクレオチド；3', -3' -ホスホルアミデート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3', -3' -ホスホジチオエート；または架橋または非架橋ヌクレオチド成分からなる群より選択される。

【0 2 5 2】

非限定的例においては、3', -キャップは、例えは、グリセリル、反転デオキシ無塩基（成分）、4', 5' -メチレンヌクレオチド；1' -（ベータ-D-エリスロフランシル）ヌクレオチド；4' -オキシヌクレオチド；5' -アミノアルキルリン酸；1, 3 -ジアミノ-2 -ブロビルリン酸；3 -アミノブロビルリン酸；6 -アミノヘキシルリン酸；1, 2 -アミノデシルリン酸；ヒドロキシブロビルリン酸；1, 5 -アンヒドロヘキシトルヌクレオチド；L -ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩ヌクレオチド；ホスホジチオエート；スレオベントフランシルヌクレオチド；非環状3', 4' -セコヌクレオチド；3', 4' -ジヒドロキシヌクレオチド成分；5 -5' -反転ヌクレオチド成分；5 -5' -反転無塩基成分；5 -5' -ホスホジチオエート；1, 4 -ブタンジオールヌクレオチド；5', -アミノ架橋および/または非架橋5', -ホスホルアミデート；ホスホロチオエートおよび/またはホスホジチオエート；架橋または非架橋ヌクレオチド成分からなる群より選択される（より詳細には、Beaucaire and Leyer, 1993, *Petrahedron* 49, 1925 (本明細書の一部としてここに引用する) を参照）。

【0 2 5 3】

“非ヌクレオチド”との用語は、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに核糖鎮に導入することができ、糖および/またはリン酸置換のいずれかを含み、残りの塩基がその酵素的活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えは、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを含ます、したがって1'位に塩基を欠失している場合、無塩基である。

【0 2 5 4】

“アルキル”基とは、飽和脂族炭化水素を表し、直鎖、分枝鎖、および環状アルキル基が含まれる。好ましくは、アルキル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1-7個の炭素を有する。より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキルである。アルキルは置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアン、アルコキシ、=O, =S, NO₂またはN(C₂H₅)₂アミノ、またはS Hである。この用語は、また、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素基である。アルケニル基を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルケニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1-7個の炭素原子、より好ましくは1-4個の炭素原子の低級アルケニルである。アルケニル基は置換されていてもされていないてもよい。置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O, =S, NO₂, ハロゲン、N(C₂H₅)₂アミノ、またはS Hから選択される。“アルキル”との用語はまた、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む不飽和の炭化水素基を有するアルケニル基を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルケニル基は1-12個の炭素を有する。より好ましくは、アルキニル基は1-4個の炭素原子、より好ましくは1-4個の炭素を有する低級アルキニル。

【0 2 5 5】

別の観点においては、本発明の s i N A 分子は、1またはそれ以上の5'および/または3'、-キャップ構造を、例えはセンス s i N A 鎮のみに、アントセンス s i N A 鎮のみに、または両方の s i N A 鎮に含む。

【0 2 5 6】

“キャップ構造”とは、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えは、A d a m i c et al. , 米国特許5, 998, 203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。これらの末端修飾は、核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、デリバリーおよび/または細胞中の局在化を助けるであろう。キャップは5'末端（5'、-キャップ）に存在してもよく、または3'末端（3', -キャップ）に存在してもよい。非限定的例においては、

である。アルキニル基は、置換されていてもされないとよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、 $=O$ 、 $=S$ 、 NO_2 または $N(C_2H_5)_2$ 、アミノまたは SH である。

【0255】

そのようなアルキル基はまた、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素環アリール、アミドおよびエステル基を含むことができる。“アリール”基とは、共役した複素環アリールおよびニアリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。アリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、トリハロメチル、ヒドロキシル、 SH 、 OH 、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアミノ基である。

“アルキルアリール”基は、アリール基（上述）に共有結合したアルキル基（上述）を表す。炭素環式アリール基は、芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されていてもよい。複素環アリール基は、芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し、環原子の残りが炭素原子である基である。適當な複素原子には、酸素、イオウ、および窒素が含まれ、例えば、フラン、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-低級アルキルピロロ、ピリミジル、ピラジニル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。“アミド”とは、 $-C(O)-NH-R$ （式中、 R はアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである）を表す。

【0256】

本明細書において用いる場合、“ヌクレオチド”は、当該技術分野においては、天然塩基（標準的）、および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は、一般にヌクレオチド構成成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸および/または塩基成分において修飾されていてもされないとよい（互換的に、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば、Usman and McSwiggen（上掲）；Eckstein et al.、国際公開WO 92/07065；Usman et al.、国際公開WO 93/15187；Uhlmann and Peyman、（上掲）（すべて本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。当該技術分野において知られる修飾核糖塩基のいくつかの例があり、Limbach et al.、1994、Nucleic Acids Res. 22, 2183にまとめられている。核糖中に導入することができる塩基修飾のいくつかの非既定的例としては、例えば、イノシン、ブリジン-4-オーン、ピリジン-2-オーン、フェニル、シュードウラシル、2', 4', 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えは5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えはリボチミジン）、5-ハロウリジン（例えは5-ブロモウリジン）または6-アミノヒリミジンまたは6-アルキルヒリミジン（例えは6-メチルウリジン）、プロビンおよびその他のものが挙げられる（Burgen et al.、1996、Biochemistry, 35, 14090；Uhlmann and Peyman、上掲）。この観点において、“修飾塩基”とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

30

40

1'つの核糖においては、本発明はリン酸基修飾を有する修飾されたs i N A分子を特徴とし、これは1またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、アミド、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミド、スルホネート、スルホアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、および/またはアルキルシリル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概要については、Hunziker and Le

10

50

umann、1995、Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417、およびMesmaeker et al.、1994、Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39を参照されたい。

“無塩基”とは、1'位において塩基を欠失しているか、または塩基の代わりに他の化学基を有する糖成分を意味する（例えば、Adamic et al.、米国特許5,998,203を参照）。

【0259】

“非修飾ヌクレオシド”とは、 $\beta-D$ -リボフーラースの1'炭素に結合した塩基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルのいずれかの塩基を意味する。

【0260】

“修飾ヌクレオシド”とは、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖および/またはリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非既定的例は式I-VIIに示されるか、および/または本明細書に記載される他の修飾である。

【0261】

本発明において記載される2'修飾ヌクレオチドに関する、“アミノ”とは、 $2'-NH_2$ または $2'-O-NH_2$ を意味し、これは修飾されていてもされないとよい。そのような修飾基は、例えば、Eckstein et al.、米国特許5,672,695およびMattulliic-Adamic et al.、米国特許6,248,878（いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する）に記載されている。

【0262】

核酸s i N A構造に対する種々の修飾を作成して、これらの分子の有用性を高めることができる。例えば、このような修飾は、製品寿命、インピトロの半減期、安定性、およびそのようなオリゴヌクレオチドを糖の部位に導入する容易さを高め、例えば、細胞膜の透過性を高め、標的とする細胞を認識し結合する能力を付与するであろう。

【0263】

核酸分子の投与。

本発明のs i N A分子は、単独で、または他の療法と組み合わせて、例えば、HIV感染に関連する病気またはAIDSの治療に用いるために適合させることができる。例えれば、s i N A分子は、被験者に投与するためのリボソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬理学的に許容しうる処方中に存在することができる。核糖分子のデリバリーの方法は、Akhtar et al.、1992、Trends Cell Biol., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotides Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al.、1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140; Hofmann and Huang、1999、Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192;およびLee et al.、2000, ACS Symp. Series, 752, 184-192（いずれも本明細書の一部としてここに引用する）に記載されている。Beigelman et al.、米国特許6,395,711およびSullivan et al.、PCT WO 94/02595は、さらに、核糖分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、実験上いかなる核糖分子もデリバリーすることができる。核糖分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与することができ、これには、限定されないが、リボソームへの封入、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン（例えは、Gonzalez et al.、1999, Bioconjugate Chemistry, 10, 1068-1074を参照），生分解性ナノカプセル、および生体接着性

10

50

10

50

小球体への組み込み、または蛋白質性ベクター (O' Harre and Normand, 国際公開 WO 00/53722) によるものが含まれる。あるいは、核酸／ヘビクリルの組み合わせを、直接注入により、または注入ポンプを用いることにより局所的にデリバリする。本発明の核酸分子の直接注入は、標準的な針とシリンジの方法論を用いて、または例えば Conry et al., 1999, *Ciiva. Cancer Res.*, 59, 2330-2337 および Barry et al., 国際公開 WO 99/31262 に記載される無針手法により、皮下、筋肉内、または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は、被験者における疾病状態を予防し、発症を調節または治療する（症状をある程度、好ましくは症状をすべて軽減する）。

【0264】

すなわち、本発明は、本発明の 1 またはそれ以上の核酸を、許容しうる担体、例えば安定剤、緩衝液等に含む医薬組成物を特徴とする。本発明のポリヌクレオチドは、安定剤、緩衝液等を用いてまたは用いずに医薬組成物を形成することにより、任意の標準的な手段により、投与（例えば、DNA、RNA、または蛋白質）し、被験者に導入することができる。リポソームデリバリー・カニズムを利用することが望ましい場合には、リポソーム形成する標準的なプロトコルにしたがうことができる。本発明の組成物はまた、経口投与には緩剤、カプセルまたはエリキシルとして；直腸投与には座剤として；滅菌溶液として；注入投与の用には懸濁液として、および当該技術分野において知られる他の組成物として、処方し使用することができる。

【0265】

本発明はまた、記載される化合物の薬学的に許容しうる処方を含む。これらの処方には上述の化合物の塩、例えば、酸付加塩（例えば、塩酸、シュウ酸、酢酸およびベンゼンスルホン酸の塩）が含まれる。

【0266】

医薬組成物または処方は、細胞または被験者（例えばヒト）への投与（例えば全身投与）に適当な形態の組成物または処方を表す。適当な形態は、部分的には、使用する投与経路（例えば経口、経皮、または注射）で依存する。このような形態は、組成物または処方が標的細胞（すなわち、負に荷電した核酸がデリバリーされることが望まれる細胞）に到達することを妨害してはならない。例えば、血流中に注入される医薬組成物は可溶性でなければならぬ。他の因子は当該技術分野において知られており、例えば、選択性、および組成物または処方がその効果を発揮することを妨害する形態等を考慮することが含まれる。

【0267】

“全身投与”とは、インビオでの全身吸収、または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸収をもたらす投与経路には、限定されないが、静脈内、皮下、臍膜内、吸入、経口、肺内および筋肉内が含まれる。これらの投与経路のその速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含む速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物の投与により、薬剤を、例えば、あるタイプの組織（例えば網状内皮系 (RES) の組織）に局所化させることができ。薬剤と細胞（例えば白血球およびマクロファージ）の表面との会合を容易にできることが可能である。この方法は、マクロファージおよび白血球による異常な細胞（例えば過剰の HIV を產生する細胞）の免疫認識の特異性を利用することにより、薬剤の標的細胞への輸送を増強するであろう。

【0268】

“薬学的に許容しうる処方”とは、本発明の核酸分子をその所望の活性に最も適した物理的位置に有効に分布させることができる組成物または処方を意味する。本発明の核糖分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる：CNS 中への薬剤の侵入を促進することができる P-糖蛋白質阻害剤 (Pluronnic P-85 等

） (Jollet-Riant and Tillement, 1999, *fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26)；大脳内移植後の筋放電送用の生分解性ポリマー、例えばポリ (DL-ラクトド-コ-グリコド) 微小球 (Emrich, D. F. et al., 1999, *Cell Transplant.*, 8, 47-58) (Akerme, Cambridge, MA)；および薬剤を、脳血管閉塞を越えて輸送することができ、神経の取り込みメカニズムを変更しする、例えばポリブチルシアノアクリレートから作成される充填されたナノ粒子 (Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。本発明の核酸分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には、Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284; Partridge et al., 1995, *PNAS USA.*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; および Tyler et al., 1999, *PNAS USA.*, 96, 7053-7058 に記載される物質が含まれる。

【0269】

本発明はまた、ポリ (エチレンギコール) 脂質 (PEG-修飾、または長期間循環リポソームまたはステルスリポソーム) を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。これらの処方は、標的組織における薬剤の蓄積を増加させる方法を提供する。この種類の薬剤組成物は、単核食細胞システム (MPS または RES) によるオブツン作用および排除に抵抗性であり、したがって、封入された薬剤の血流循環時間を長くし、組織への暴露を増強する (Lasic et al., *Chem. Rev.*, 1995, 95, 260-1-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1, 1995, 43, 1005-1011)。そのようなりポソームは、おそらくは脈管新生組織における溢出および捕獲のため、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている (Lasic et al., *Science*, 1995, 267, 1275-1276; Okuyama et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90)。長期間循環リポソームは、特に、MPS の組織で蓄積することが知られている慣用のカチオン性リポソームと比べて、DNA および RNA の薬物動態学および生物学を増強する (Liuet al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 国際公開 WO 96/10390; Holland et al., *Ansell et al.*, 国際公開 WO 96/10392)。長期間循環リポソームはまた、代謝的に攻撃的な MPS 組織、例えば肝臓および脾臓における蓄積を回避するその能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較して薬剤を又クリアーゼ分解からより強く保護するようである。

【0270】

本発明はまた、薬学的に有効量の所望の化合物を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む、保存または投与用に調整される組成物を含む。治療用途に用いるための許容する担体または希釈剤は、医薬の技術分野においてよく知られており、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. 1985) (本明細書の一例としてここに引用する) に記載されている。例えば、保存剤、安定剤、染料、および風味剤を用いることができる。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびピロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤を用いてもよ

は、治療される宿主および投与の特定のモードに依存して様々である。投与量単位形は、一般に、約1mg-約500mgの活性成分を含む。

【0283】
特定の被験者についての特定の投与量レベルは、種々の因子、例えば、用いる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排泄速度、薬剤の組み合わせ、および治療をしている特定の疾病の重篤性に依存することがある。

【0284】
ヒト以外の動物に投与するためには、組成物を動物飼料または飲料水に加えてよい。動物が治療上適当な量の組成物を飼料とともに摂取できるよう、動物飼料および飲用水組成物を処方することが便利である。飼料または飲料水に加えるように組成物をフレミックスとして製造することも便利であろう。

【0285】
本発明の核酸分子はまた、他の治療用化合物と組み合わせて被験者に投与して、全体的治療効果を高めることができる。ある適応症の治療に複数の化合物を用いることにより、副作用の存在を低下させながら有益な効果を高めることができる。

【0286】

1つの被験者においては、本発明は、特定の細胞タイプに本発明の核酸分子を投与するのに適した組成物を含む。例えば、アシクロ糖蛋白レセプター（ASGPr）（Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432）は、肝細胞に特徴あり、分枝鎖ガラクトース末端糖蛋白質、例えばアシクロオロソムコイド（ASOR）に結合する。別の例においては、多くの癌細胞中で葉酸レセプターが過剰発現されている。そのような糖蛋白質、合成グリココンジュゲート、または葉酸のレセプターへの結合は、オリゴサッカライド鎖の分枝の程度に強く依存する親和性を生ずる。例えば、三触角構造は、二触角または一触角鎖より高い親和性で結合する（Benzinger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945）。Lee and Lee (1987, Glycoconj. J., 4, 317-328)は、ガラクトースと比較してより高い親和性を有するN-アセチル-D-ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この“グラスターリング効果”はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および吸収についても記載されている（Ponnipom et al., 1981, J. Med. Chem., 24, 1388-1395）。ガラクトースアミンまたは葉酸に基づくコンジュゲートを使用して外来性化合物を細胞膜を超えて輸送することにより、例えば、肝疾患、肝臓の癌、または他の癌の治療に標的化デリバリー法を提供することができる。また、バイオコンジュゲートの使用により、治療に必要な治療用化合物の必要用量を低下させることができる。さらに、本発明の核酸バイオコンジュゲートを使用することにより、治療薬の生物利用性、薬力学、および薬物動態的パラメータを調節することができる。そのようなバイオコンジュゲートの非限局的例は、Varroes et al., 米国特許出願10/201,394, (2001年8月13日出願); およびMatulic-Adamcik et al., 米国特許出願60/362,016 (2002年3月6日出願)に記載されている。

【0287】

あるいは、本発明のある種のsiNA分子は、細胞中で真核生物プロモーターから発現させることができ（例えば、Izant and Weintraub, 1985 Science 239, 345; McGarry and Lindquist, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, 50

J. Virol. 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, J. Virol. 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990, Science 247, 1222-125; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45)。当業者は、真核生物細胞中で任意の核酸を適当なDNA/RNAベクターから発現させることができることを認識するであろう。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができ（Drapet et al., PCT WO 94/02595; Okawa et al., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Venkata et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowdhury et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 25856)。

【0288】

本発明の別の観点においては、本発明のRNA分子は、DNAまたはRNAベクター中に挿入された転写ユニットから発現させることができる（例えばCouture et al., 1996, TIG., 12, 510を参照）。組換えベクターは、DNAプラスミドであってもウイルスベクターであってもよい。siNAを発現するウイルスベクターは、アデノウイルスにおいて構築することができる。別の被験者においては、poliovirusに基づくコンストラクトを用いて、本発明の核酸分子を発現させる（例えば、Thompson, 1990, 米国特許5,902,880および6,146,886を参照）。siNA分子を発現し得る組換えベクターは、上述のようにデリバリーされ、標的細胞中に残留することができる。あるいは、核酸分子の過剰発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、siNA分子は標的mRNAと相互作用して、RNAi応答を生ずる。siNA分子を発現するベクターの輸送は、全身的（例えば、静脈内または筋肉内投与により）、患者から外植された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中の導入を可能とする他のいすれかの手段により、行うことができる（総説については、Couture et al., 1996, TIG., 12, 510を参照）。

【0289】

1つの観点においては、本発明は、少なくとも1つの本発明のsiNA分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。発現ベクターは、siNAデュープレックスクの一方または両方の鎖、または自己ハイブリダイズしてsiNAデュープレックスクを生ずる1本の自己相補鎖をコードすることができる。本発明のsiNA分子をコードする核酸配列は、そのsiNA分子の発現を可能とする様式で動作可能なよう連続することができる（例えば、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500;およびNovina et al., 2002, Nature Medicine, 8, 681-686を参照）。

【0290】

別の観点においては、本発明は、以下を含む発現ベクターを特徴とする：a) 転写開始領域（例えば真核生物pol I, IIまたはIIIの開始領域）；b) 転写終止領域（

例えば真核生物 p o 1 1, 1 1 または 1 1 1 の終止領域) ; および c) 本発明の s i N A 分子の発現

A 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を含み, 前記配列は, s i N A 分子の発現

および / またはデリバリーを可能とする様式で, 前記開始領域および前記終止領域に動作

可能なように連結されている。ベクターは, 任意に, 本発明の s i N A をコードする配列

の 5'側または 3'側に動作可能なように連結された蛋白質のオーブンリーディングフレ

ーム (ORF) ; および / またはイントロン (介在配列) を含んでいてもよい。

【0 2 9 1】

s i N A 分子配列の転写は, 真核生物 RNA ポリメラーゼ I (p o l I), RNA ポリメラーゼ II (p o l I I), または RNA ポリメラーゼ III (p o l I I I) のプロモーターにより推進させることができる。p o l I I または p o l I I I プロモーターからの転写産物は, すべての細胞において高いレベルで発現される。あるタイプの細胞におけるある p o l I I I プロモーターのレベルは, 近くに存在する遺伝子制御配列 (エンハンサー, サイレンサー等) の性質に依存する。真核生物 RNA ポリメラーゼ酵素が適当な細胞中で発現される限り, 真核生物 RNA ポリメラーゼプロモーターもまた用いられる (E l r o y - S t e i n a n d M o s s, 1 9 9 0 P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A., 8 7, 6 7 4 3 - 7 ; G a o a n d H u a n g, 1 9 9 3 N u c l e i c A c i d s R e s., 2 1, 2 8 6 7 - 7 2 ; L i e b e r e t a l., 1 9 9 3 M e t h o d s E n z y m o l., 2 1 7, 4 7 - 6 6 ; Z h o u e t a l., 1 9 9 0 M o l. C e l l. B i o l., 1 0, 4 5 2 9 - 3 7)。何人かの研究者が, そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞中で機能することを示している (例えば, K a s h a n i - S a b e t e t a l., 1 9 9 2 A n t i s e n s e R e s. D e v., 2, 3 - 1 5; O j w a n g e t a l., 1 9 9 2 P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A., 8 9, 1 0 8 0 2 - 6; C h e n e t a l., 1 9 9 2 N u c l e i c A c i d s R e s., 2 0, 4 5 8 1 - 9; Y u e t a l., 1 9 9 3 P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A., 9 0, 6 3 4 0 - 4; L ' H u i l l i e r e t a l., 1 9 9 2 E M B O J. 1 1, 4 4 1 1 - 8; L i s z t i e w i c z e t a l., 1 9 9 3 P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A., 9 0, 8 0 0 0 - 4; T h o m p s o n e t a l., 1 9 9 5 N u c l e i c A c i d s R e s., 2 3, 2 2 5 9; S u l l e n g e r & C e c h, 1 9 9 3, S c i e n c e, 2 6 2, 1 5 6 6)。より詳細には, 転写ユニット, 例えば U 6 小核 (s n R N A), 転写 R N A (t r R N A) およびアデノウイルス V A R N A をコードする遺伝子に由来するものは, 細胞中において高濃度の所望の R N A 分子 (例えば s i N A) を生成するのに有用である (T h o m p s o n e t a l., (上掲); C o u t u r e a n d S t i n c h o m b, 1 9 9 6, (上掲); N o o n b e r g e t a l., 1 9 9 4, N u c l e i c A c i d R e s., 2 2, 2 8 3 0; N o o n b e r g e t a l., 1 9 9 7, G e n e T h e r., 4, 4 5; B e i c r e l m a n e t a l., 國際公開 W O 9 6 / 1 8 7 3 6)。

上述の s i N A 転写ユニットは, 哺乳動物細胞中に導入するため種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては, 調定されないが, プラスミド D N A ベクター, ウイルス D N A ベクター (例えばアデノウイルスまたはアデノ・随伴ウイルスベクター) またはウイルス R N A ベクター (例えばレトロウイルスまたはアルファウイルスベクター) が挙げられる (総説については, C o u t u r e a n d S t i n c h o m b, 1 9 9 6, (上掲) を参照)。

【0 2 9 2】

別の観点においては, 本発明は, 本発明の s i N A 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を, その s i N A 分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1 つの様式においては, 発現ベクターは, a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; および c) s i N A 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み; この配列は, s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能と/or またはイントロン (介在配列) を含んでいてもよい。

域に動作可能なように連結されている。

【0 2 9 3】

別の様様においては, 発現ベクターは, a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; c) オープンリーディングフレーム; および d) s i N A 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み, この配列は, オープンリーディングフレームの 3' - 末端に動作可能なように連結されており, 配列は, s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で, 開始領域, オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

【0 2 9 4】

別の様様においては, 発現ベクターは, a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; c) オープンリーディングフレーム; および d) 少なくとも 1 つの s i N A 分子をコードする転写終止領域; c) イントロン; および d) 少なくとも 1 つの s i N A 分子をコードする核酸配列を含み; この配列は, オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されており, 配列は, s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で, 開始領域, オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

【0 2 9 5】

H I V の概要

A I D S (後天性免疫不全症候群) は, 1 9 8 1 年に米国で最初に報告され, それ以来主要な世界的流行病となつた。A I D S は, ヒト免疫不全ウイルス (H I V) により引き起こされる。H I V は身体の免疫系の細胞を殺すか傷害を与えることにより, 感染およびある種の病と戦う身体の能力を進歩的に破壊する。A I D S と診断された人々は, 通常は健康な人々を病氣にしない微生物, 例えはウイルスまたは細菌により引き起こされる, 日和見感染と称される生命を脅かす病にかかりうる。1 9 8 1 年以来, 米国では 7 9 0, 0 0 0 以上のA I D S の症例が報告されており, 9 0 0, 0 0 0 人ものアメリカ人がH I Vに感染している。

【0 2 9 6】

H I V 感染により, 慢性の進行性の病氣となる。その経過はウイルス複製のレベルの増加およびより有毒なウイルス株の出現により示される。このプロセスは免疫系の破壊を引き起こす。H I V 感染は, C D 4 細胞数および臨床症状により段階が区別される。すべての人がすべての段階を経て通常は行なわぬが, また時間経過も人によって非常に異なる。H I V に感染した後, 通常はセロコンバージョン疾患が生じ, 次に無症候性期がある。これは数ヶ月から数年続く (1 - 8 年まで, ただし平均は 1 年である)。この後に症候性期となり, これは進行性免疫不全と相関する。H I V 疾病の進行は人により様々である。これは多くの因子, 例えは遺伝および伝達モードによって異なる。ウイルス負荷量は, 血液中のウイルス量を測定し, 進行の速度を推定するのに重要な代理マーカーである。これは R N A コピー / m l で測定される。また, これを用いて, 薬剤療法に対する応答を評価し, 薬剤耐性の発達を予測することができる。セロコンバージョンの後, それそれの人はウイルス負荷量の設定値を発生させる。ウイルス負荷量が低ければ低いほど, H I V 疾病 (すなわち免疫系の破壊), 最終的な臨床症状および日和見状態の進行は遅い。H I V に感染した人々の 5 0 - 9 0 % は急性の臨床疾患を有し, これは典型的には H I V への感染性暴露の 2 - 4 週間後に生ずる。症状は非特異的 (ウイルスまたはインフルエンザ様) でありうるため, しばしばこれらのセロコンバージョン疾患は回顧的に認識される。多くの者は单核細胞塞性疾患を発症し, これは急性的に始まり, 2 週間まで続く。症状には, 熱, 頭痛, リンパ節腫, 筋肉痛, 発疹, および粘膜皮膚発赤が含まれる。実験室では, すればウイルス感染を示すかもしれない。H I V に対する抗体はまだ形成されないが, H I V P 2 4 抗原は検出される。この時点ではウイルス負荷量は非常に高く, セロコンバージョンの間, C D 4 数は過渡的に低下する。

【0297】

HIVはレンチウイルスファミリーのレトロウイルスメンバーである。レトロウイルスエンベロープを有するRNAウイルスであり、逆転写酵素と称されるRNA依存性DNAポリメラーゼを有することを特徴とする。2つのタイプのウイルスがヒトに影響を与えることが知られている。HIV-1はAIDSを引き起こし、世界中で見いだされる。HIV-2はアフリカ人のAIDSの症例において単離されている。

【0298】

ウイルスは、細胞外における形として、直径約100nmの脂質に被覆された円筒形のヌクレオカプシドとして存在する。その脂質エンベロープ中に糖蛋白質が挿入されており、その一部（糖蛋白質[8p]120）は、宿主細胞（T-リンパ球ヘルパー細胞、活性化単球およびマクロファージ、およびグリーア細胞）のCD4レセプターに結合する結果域を形成する。ウイルスは、細胞膜と融合し、細胞質に入つた後、そのエンベロープを失い、RNAのDNAへの逆転写が生ずる。

【0299】

ウイルスDNAは、ウイルスのエンドヌクレアーゼにより、宿主細胞DNA中に潜伏性プロウイルスとしてインテグレートされる。宿主細胞が潜伏的に感染していれば、感染は発症しない。宿主が活動的に感染していれば、プロウイルスDNAが転写され、翻訳され、ウイルス蛋白質およびRNAが產生される。ウイルス蛋白質は集合し、宿主細胞の形質膜を通して新たなビリオンとして発芽する（リバースエンンドサイトーシス）。ウイルスは発芽または細胞から細胞への移動により播種される。

【0300】

HIV疾患の重症度が進行するにつれて、免疫系のすべての成分の異常が見られる。HIV感染の最も重要な結果は細胞媒介性（T細胞）免疫の偏弱である。HIVはTヘルパーア細胞のCD4レセプターに親和結合し、そのためこのT細胞集団が進行的に凋滅する。その結果、免疫系は次の能力が低下する：（1）ウイルスに感染した細胞または癌に対する細胞毒性T細胞応答を高める、（2）遲延型過敏性反応を形成する、および（3）新たな外来物質を処理して免疫系に提示する。HIVに感染したほとんどの人では、体液性免疫系の著しい障害が生ずる。HIVは単球およびマクロファージにも感染し、うる。

【0301】

したがって、HIV遺伝子を標的とする小分子核酸分子の使用は、HIV感染およびAIDS、ならびに免疫学的疾患またはHIV遺伝子の調節に応答する他の任意の疾病または病気を治療するために用いることができる一群の新規治療剤を提供する。

【実施例1】

【0302】

以下は本発明の核酸の選択、単離、合成および活性を示す非限定的例である。

【0303】

s i N A コンストラクトのタンデム合成

本発明の例示的s i N A分子は、切断可能なリソソーム、例えば、スクシニル系リン酸を用いて、タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後に、1段階糖鎖スクリーニングを行って、RNA分子を高収率で得る。この方法はハイスクリーブRTNAエラーエルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

【0304】

5'末端ジメトキシトリチル（5'-O-DMT）基がそのまま残るs i N Aオリゴ核苷およびその相補鎖のタンデム合成（トリチルオノン合成）が完了した後、オリゴヌクレオチドを上述のようにして脱保護する。脱保護の後、s i N A配列鎖を自動的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより、一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し、相補鎖が末端5'-ヒドロキシルを含むデュープレックスが得られる。新たに形成されたデュープレックスは、1つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず、日常的な固相抽出精製（トリチルオノン精製）の間、単一の分子として振る舞う。これらの

鎖は安定なデュープレックスを形成するため、オリゴの対を例えればC18カートリッジを用いて精製するためには、このジメトキシトリチル基（または同等の基、例えば他のトリチル基または他の疏水性成分）のみが必要である。

【0305】

タンデムリンクー（図1を参照）または同等の切断可能なリンクーまたはダリセリヌクシニカルボスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンクー結合条件の非限定的例には、活性化剤、例えばプロモトリヒドロジノホスホニウムヘキサフルオロリノ酸（PYB r O P）の存在下で、妨害基、例えばジソブロピルエチルアミン（DIP A）およびDMAFを使用することが含まれる。リンクーを結合させた後、標準的な合成化学を用いて第2の配列の合成を完了し、末端の5'-O-DMTはそのまま残す。合成後、得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがつて脱保護し、適当な緩衝液、例えば、50mM NaOAcまたは1.5M NH₄Cl₂で反応を停止させる。

【0306】

s i N Aデュープレックスの精製は、固相抽出、例えば、1カラム容量（CV）のアセトニトリル、2CVのH₂O、および2CVの50mM NaOAcで調整したWater Sep Pak 1gカートリッジを用いて、容易に行なうことができる。サンプルを負荷し、1CVのH₂Oまたは50mM NaOAcおよび50mM NaClを含む）を溶出する。次にカラムを1CVのH₂O等で洗浄し、例えば、1CVの1%水性トリフルオロ酢酸（TFA）をカラムに通し、次にさらに1CVの1%水性TFAをカラムに加えて約10分間放置することにより、カラム上で脱トリチル化を行う。残りのTFA溶液を除去し、カラムをH₂Oで、次に1CVの1M NaClおよび再度のH₂Oで洗浄する。次にs i N Aデュープレックス生成物を、例えは、1CVの2.0%水性CANを用いて溶出する。

【0307】

図2は、精製したs i N AコンストラクトのMALDI-TOF質量分析の例を示し、ここで、各ピークはs i N Aデュープレックスの個々のs i N A鎖の計算質量に対応する。同じ精製s i N Aは、キャビラリーゲル電気泳動（CGE）で分析したときに3つのピークを与える。1つのピークはおそらくはデュープレックスs i N Aに対応し、2つのピークはおそらく個々のs i N A配列鎖に対応する。同じs i N Aコンストラクトのイオン交換HPLC分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルシフェラーゼポーターアッセイを用いる精製s i N Aコンストラクトの試験は、個々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したs i N Aコンストラクトと比較して、RNA活性が同じであることを示した。

【0308】

実施例2：任意のRNA配列中の潜在的s i N A標的部位の同定

本発明の例示的s i N A分子は、ヒトmRNA転写産物の配列を、例えはコンピューターフォールディングアルゴリズムを用いることにより、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbank等のデータベースから得られる遺伝子またはRNA遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有するs i N A標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えは、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または健康状態と関連していることが知られている標的、例えは変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とするs i N A分子を設計することができる。個々のパラメータを用いて、標的RNA配列中でいずれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、固定されないが、二次または三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基

組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、またはRNA転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、RNA転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インヒトRNA切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力についてs i N A分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべきs i N Aコンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいざれかの位置の1-100個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するマルチウェルまたはマルチプレートアッセイを用いて、s i N A分子をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

【0309】

実施例3: RNA中のs i N A分子標的部位の選択。または転写産物を標的とするs i N Aの選択を行うことができる。

【0310】

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば2-3ヌクレオチドメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつらえのPer1スクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、Oligo, MatVecator、またはthe G C C W i s c o n s i n P a c k a g eも同様に用いることができる。

【0311】

2. 場合によっては、s i N Aは2以上の標的配列に対応する。これは、例えば、同じ遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、2以上の中の遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、またはヒト遺伝子と動物ホモログとの両方を標的とする場合に生じうる。この場合には、それぞれの標的配列のリストを生成し、次にリストを比較して、各リスト中でマッチング配列を見出す。次に、サブ配列を、所定のサブ配列を含む標的配列の数としたがってランク付けする。この目的は、標的配列のほとんどまたはすべてに存在するサブ配列を見出すことである。あるいは、ランク付けにより、標的配列にユニークなサブ配列、例えば変異体標的配列を同定することができる。このようない方法により、変異体配列を標的的に標的とし、正常な配列の発現に影響を及ぼさないs i N Aの使用が可能となるであろう。

【0312】

3. 場合によっては、s i N Aのサブ配列は、iまたはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、s i N Aが標的とされないままでいるべきバラゴンスマリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のケース2におけるように、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、標的遺伝子中に存在するが標的ではないバラゴン中には存在しない配列を見出だす。

【0313】

4. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、GCC含量にしたがってランク付けすることができる。30-70%のGCCを含有する部位が好ましく、10-60%のGCCを含有する部位がさらに好ましい。

【0314】

5. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、自己フォールディングおよび内部ヘアピンにしたがってランク付けすることができる。内部フォールディングおよび弱いことが好ましい。強いヘアピン構造は回避すべきである。

【0315】

6. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、配列中にGCCまたはCCG（またはさらに多いG）が存在すると、オリゴヌクレオチド合成に問題が生じることがあり、RNA1活性を妨害する可能性がある。したがって、よりよい配列が利用可能であ

る限り、これは回避する。CCCはアンチセンス鎖にGGGを配置するため、標的鎖中で検索する。

【0316】

7. ランク付けされたs i N Aサブ配列をさらに分析して、配列の3'末端にジヌクレオチドUU（ウリジンヌクレオチド）を、および/または配列の5'末端にA（アンチセンス配列に3', UUを生ずる）を有するか否かにしたがってランク付けする。これらにより、末端TT（ミジンヌクレオチド）を有するs i N A分子を設計することが可能となる。

【0317】

8. 上述のようにランク付けされたサブ配列のリストから4個または5個の標的部位を選択する。次に、例えば、2-3ヌクレオチドを有するサブ配列において、それぞれの選択された2-3-merサブ配列の右側2-1ヌクレオチドをs i N Aデューブレックスの上側（センス）鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された2-3-merサブ配列の左側2-1ヌクレオチドの逆相補鎖をs i N Aデューブレックスの下側（アンチセンス）鎖用に設計し合成する（表11およびIIを参照）。末端TT残基が配列にとって望ましい場合には（パラグラフ4に記載されるように）、オリゴを合成する前にセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の2つの3'末端ヌクレオチドをTTで置き換える。

【0318】

9. s i N A分子をインヒトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性なs i N A分子、または標的RNA配列中の最も好ましい標的部位を同定する。

【0319】

別の方針においては、H IV標的配列に特異的なs i N Aコンストラクトのペールを用いて、H IV RNAを発現する細胞、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系において、標的部位についてスクリーニングする。この方法において用いられる一般的な範囲は図9に示される。そのようなペールの非限定的例は、それぞれ、配列番号1-738、1477-1490、1499-1506、1515-1522、1531-1534、1539-1546、1555-1556、1559-1566、および1575-1576を含むセンス配列、および配列番号739-1476、1491-1498、1507-1514、1523-1530、1535-1538、1547-1554、1557-1558、および1567-1574を含むアンチセンス配列を有する配列を含むペールである。H IVを発現する細胞（例えばA549またはCaCO-2細胞）をs i N Aコンストラクトのペールでトランسفェクトし、H IVの阻害に伴う表現型を示す細胞を分離する。s i N Aコンストラクトのペールは、適当なベクター中に挿入された翻訳活性セットから発現させることができる（例えば、図7および図8を参照）。ポジティブの表現型変化（例如、増殖の低下、H IV mRNAレベルの低下またはH IV蛋白質発現の低下）を示す細胞からs i N Aをシーケンスして、標的H IV RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

【0320】

実施例4: H IVを標的とするs i N Aの設計

s i N Aの標的部位は、実施例3に記載されるs i N A分子のライブライアリを用いて、あるいは本明細書の実施例6に記載されるようなインヒトロs i N Aシステムを用いて、H IV RNA標的の配列を分析し、任意のフォールディング（s i N Aの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。H IV-1 RNA標的の配列（例えば、表11に示されるGenbank登録番号）を分析し、任意のフォールディング（s i N Aの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。A株およびB株に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。A株およびB株が現在最も優勢な株である場合、H IVのすべての既知のAおよびB株の配列アライメントをホモロジーについてスクリーニングし、これらの株に共通する保存配列を標的と

適当なプラスミドから T₇ RNA ポリメラーゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンス siNA 鎮（例えば各 2.0 μM）は、緩衝液（例えば、1.00 mM 酢酸カリウム、3.0 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 2 mM 酢酸マグネシウム）中で 90 °C で 1 分間、次に 37 °C で 1 時間インキュベートすることによりアニーリングさせ、次に溶解緩衝液（例えば 1.00 mM 酢酸カリウム、3.0 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2 mM 酢酸マグネシウム）で希釈する。アニーリングは、アガロースゲルを用いて TBE 緩衝液でゲル電気泳動し、臭化エチジウムで染色することによりモニターすることができる。ショウジョウバエの溶解物は、Oregon R ハエからの 0-2 時間鰐の胚を用いて調製し、酵母糖蜜寒天上に回收し、紙膜を除き溶解する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、5.0% 溶解物 [v/v/v]、RNA (1.0-5.0 pM) の最終濃度、および siNA (1.0 nM の最終濃度) を含む 1.0% [v/v/v] 溶解緩衝液を含む反応混合物を含む。反応混合物はまた、1.0 mM のクレアチニン酸、1.0 μg/ml のクレアチニンホスホキナーゼ、1.00 μM の GTP、1.00 μM の UTP、1.00 μM の CTP、5.00 μM の ATP、5 mM の DTT、0.1 U/μL の RNase in (Promega)、および 1.00 μM の各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は 1.00 mM に調節する。反応は氷上で 30 分間インキュベートした後に RNA を加え、2.5 °C で 10 分間ブレインキュー 2.5 X Passive Lysis Buffer (Promega) で反応を停止させた。標的 RNA の切断は、RT-PCR 分析または当該技術分野において知られる他の方法によりアッセイし、反応から siNA が省略されている対照反応と比較する。

【0327】

あるいは、アッセイ用の内部標識した標的 RNA を [アルファ-³²P] CTP の存在下でインビトロ転写により調製し、スピノクロマトグラフィーにより G50 セファデックスカラムを通し、さらに精製することなく標的 RNA として用いる。任意に、標的 RNA は T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて 5'-³²P 末端標識してもよい。アッセイは上述のようにして行い、標的 RNA および RNA_i により生成する特異的 RNA 切断産物をゲルのオートラジオグラフィーで可視化する。切断のパーセントは、無標の対照 RNA_i または siNA なしの対照反応からの RNA、およびアッセイにより生成する切断産物を示すバンドを Phosphor Imager (登録商標) で定量することにより決定する。

【0328】

1 つの被験においては、このアッセイを用いて、siNA 媒介性 RNA_i 切断のための H_{IV} RNA 標的的部位を決定する。すなわち、例えば、標識した標的 RNA の電気泳動によりアッセイ反応を分析することにより、またはノザンプロットにより、なじび I_{IV} RNA 標的の RNA_i 媒介性切断についてスクリーニングする。

【0329】 実施例 7: H_{IV} 標的 RNA のインビトロでの核酸切断。

上述したようにして、ヒト H_{IV} RNA を標的とする siNA 分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビトロで切断活性にについて試験することができる。H_{IV} RNA 中の標的配列およびヌクレオチドの位置は表 I-1 および II-1 に示される。

【0330】

2 つのフォーマットを用いて、H_{IV} を標的とする siNA の効力を試験する。第 1 に例えは、B 細胞、T 細胞、マクロファージまたは内皮細胞培養系を用いて、細胞培養において試薬を試験して、RNA および蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように、H_{IV} 標的に対する siNA 試薬（例えば、表 I-1 および II-1 を参照）を選択する。これらの試薬を適当なトランスクレクション試薬により、例えは、B 細胞、T 細胞、マクロファージまたは内皮細胞にデリバリーした後、RNA 阻害を測定する。增幅

のリアルタイム PCR モニタリング（例えば、ABI 7700 Taqman (登録商標)）を用いて、アクトンに対する標的 RNA の相対量を測定する。無関係標的に対する、または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれぞれの位置でランダムに置換されるランダム化 siNA 対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物と比較する。標的に対して一次および二次のリート試薬を選択し、最適なトランスクレクション試薬濃度を選択した後、リード siNA 分子を用いて RNA の阻害の経時変化を測定する。さらに、細胞一アーティティングフォーマットを用いて RNA 阻害を決定することができる。

【0331】

siNA の細胞へのデリバリー 細胞（例えは、B 細胞、T 細胞、マクロファージまたは内皮細胞）は、トランスクレクションの前日に、例えは、EGM-2 (Biotracket) 中で 1×10^5 細胞 / ウエルで 6-ウエルディッシュに播種する。siNA（例えは最終濃度 2.0 nM）およびカチオン性脂質（例えは最終濃度 2 μg/ml）を、ポリスチレン管で EGM 基礎培地 (Biowhittaker) 中で、37 °C で 30 分間複合化させる。ポルテックスした後、複合化した siNA を各ウエルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のためには、例えは、 1×10^3 個の細胞を 9.6 ウエルプレートに播種し、記載されるようにして siNA 混合物を加える。siNA の細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合化した蛍光 siNA を用いて決定する。6 ウエルディッシュ中の細胞を siNA とともに 24 時間インキュベートし、PBS ですすぎ、2% バラホルムアルデヒド中で室温で 1.5 分間固定する。siNA の取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

【0332】

siNA の PCR 反応緩衝液 (PE-Applied Biosystems), 5.5 mM MgCl₂, 3.00 μM の各 dNTP, dCTP, dGTP, および dTTP, 1.00 U の RNase 阻害剤 (Promega), 1.25 U の AmpliTaq Gold (PE-Applied Biosystems) および 1.0 U の M-M I.V. Polymerase (Promega) から構成される 0.01 U の反応液を用いて行う。熱サイクルクリッピング条件は、4.8 °C で 30 分間、9.5 °C で 10 分間、次に 95 °C で 1.5 秒間および 6.0 °C で 1 分間を 4.0 サイクルからなるものである。mRNA レベルの定量は、段階的に希釈した細胞 RNA (3.0, 1.0, 0.33, 0.11 nM) から生成した標準に対する行い、平行して TaqMan 反応で測定した β-アクチンまたは GAPDH mRNA に対して標準化する。目的とする各遺伝子について、上側プライマーおよび下側プライマー、および蛍光標識したプローブを設計する。特定の PCR 産物中への SYBR Green I 染料のリアルタイム取り込みは、ガラスキャビリリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照 cRNA を用いて、各プライマー対について標準曲線を作成する。値は、各サンプルにおいて GAPDH に対する相対的発現として表す。

【0333】

核酸抽出物は、標的的なマイクロ調製手法（例えは、Andrews and Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499 を参考）を用いて調製することができる。例えは TCA 沈殿を用いて、上清からの蛋白質抽出

物を調製する。等量の20%TCAを細胞上清に加え、氷上で1時間インキュベートし、5分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し、乾燥し、水に再懸濁する。細胞蛋白質抽出物を10%Bis-Tris NuPage (核抽出物)または4-12%Tris-グリシン(上清抽出物)ポリアクリルアミドゲルに流し、ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合は、例えば、5%無脂乳とともに1時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ、次に一次抗体で4℃で16時間反応させる。洗浄した後、二次抗体、例えば(1:10, 000希釈)を室温で1時間適用し、Supersignal試薬(Pierce)でシグナルを検出する。

【0334】実施例8: HIV遮伝子発現のダウンレギュレーションを評価するのに有用なモデル

細胞培養

当該技術分野において一般に知られるように、本発明のsINAコンストラクトを細胞の細胞培養系において用いて、抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系は、本発明のsINA分子のスクリーニングに容易に適合させることができ細胞培養系の非限定的例である。非限定的例においては、本発明のsINA分子は、Lee (2002, Nature B Biotechnology, 19, 500-505)に記載されるように、U6snRNAプロモーター活性発現系を用いて、HIV-1pNL4-3プロウイルスDNAとともに2.93/EcR細胞にコトランスフェクションする。

【0335】

非限定的例においては、Lee (上掲)に記載されるように、sINA発現ベクターはpTZU6+1ベクターを用いて以下のように製造する。一方のカセットは21'クレオチドのアンチセンス配列(表1)を有する。この配列は、本明細書に記載されるHIV-1 RNA標的を標的とするよう設計する。これらの配列は、本明細書に記載されるHIV-1 (S/AS-1R)に相補性を有しない無関係のセンスおよびアンチセンス(S/AS)配列をpTZU6+1ベクターに接合する。sINAまたは対照コンストラクトで過量的にコトランスフェクションした細胞を細胞培養液と混合し、室温で20分間インキュベートし、HIV-1pNL4-3プロウイルスDNAとともに2.93細胞にコトランスフェクションする。sINAコンストラクト(表1-1)を、例えば、2.93細胞において、HIV-RNA発現を減少させる効力について試験する。トランスフェクションの時点では細胞が70-90%コントロールであるように、トランスフェクションの約24時間前に、96ウェルプレートに5, 100-7, 100μl/ウェルで細胞を播種する。トランスフェクションのために、アーニーリングしたsINAを5.0μl/ウェルの容量でトランスフェクション試薬と混合し、室温で2.0分間インキュベートし、HIV-1pNL4-3プロウイルスDNAとともに2.93細胞にコトランスフェクションする。sINAトランスフェクション混合物を細胞に加えて、150μlの容積で最終sINA濃度を2.5nMとする。各sINAトランスフェクション混合物を3回のsINA処理用に3つのウェルに加える。細胞をsINAトランスフェクション混合物の逆流的存続下で37℃で24時間インキュベートする。24時間において、処理した細胞の各ウェルからRNAを調製する。まずトランスフェクション混合物を有する上清を除去して廃棄し、次に細胞を溶解し、各ウェルからRNAを調製する。処理後の標的遮伝子の発現を、標的遮伝子および標準化用に对照遮伝子(3.6B4, RNAポリメラーゼサブユニット)についてRT-PCRにより評価する。さらに、ELISAを用いてHIV-1p24ウイルス抗原レベルを測定することができる。3回の実験のデータを平均し、各処理について標準偏差を求める。標準化したデータをグラフに表し、活性なsINAによる標的mRNAの減少のパーセントをそれぞれの反応対照sINAと比較して判定する(例えば、Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 20, 500-505を参照)。

20

【0336】

抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングするための他の細胞培養モデル系は当該技術分野において知られている。例えば、Duzruness (2001, Nucleic Acids, 20 (4-7), 515-523), Cagnun (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10, 251), Ho (1995, Stem Cell, 1, 13, supp 3, 100)およびBaur (1997, Blood, 89, 2259)は、本発明の組成物および本明細書に記載されるアッセイにおいて用いるために容易に適合させることができる細胞培養系を記載する。

【0337】

動物モデルにおいて抗HIV剤の効力を評価することは、ヒトの臨床試験の重要な前提条件である。本発明のsINAコンストラクトは、種々の動物モデルにおいて評価するこ

とができる。これらには、例えば、中空HIVモデル(例えば、Gruenberg, 米国特許5,627,070を参照)、CD4プロモーターおよびエンハンサーからHIV-1遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いるAIDS用のマウスモデル(例えば、Jolicœur, 國際公開WO98/50535を参照)、およびまたはHIV/SIV非ヒト靈長類モデル(例えば、Narayan, 米国特許5,849,992を参照)が含まれる。sINA化合物およびウイルスは、本明細書に記載され、当該技術分野において知られるように、種々の方法および経路で投与することができる。これらのモデルにおける結果の定義は、種々の方法、例えば、定量的PCR、定量的およびパルク共培養アッセイ、血漿共培養アッセイ、抗原および抗体検出アッセイ、リンパ球増殖、細胞内サイトカイン、フローサイトメトリ、ならびに血液学およびCBC評価により行うことができる。さらに別の動物モデルは当該技術分野において一般に知られている。例えば、B15(2000, Mol. Ther., 1, 244)を参照。

【0338】

実施例9: HIV RNA発現のRNAi媒介性阻害

HIV

sINAコンストラクト(表1-1)を、例えば、2.93細胞において、HIV-RNA発現を減少させる効力について試験する。トランスフェクションの時点では細胞が70-90%コントロールであるように、トランスフェクションの約24時間前に、96ウェルプレートに5, 100-7, 100μl/ウェルで細胞を播種する。トランスフェクションのために、アーニーリングしたsINAを5.0μl/ウェルの容量でトランスフェクション試薬と混合し、室温で2.0分間インキュベートし、HIV-1pNL4-3プロウイルスDNAとともに2.93細胞にコトランスフェクションする。sINAコンストラクト(表1-1)を、例えば、2.93細胞において、HIV-RNA発現を減少させる効力について試験する。トランスフェクションの時点では細胞が70-90%コントロールであるように、トランスフェクションの約24時間前に、96ウェルプレートに5, 100-7, 100μl/ウェルで細胞を播種する。トランスフェクションのために、アーニーリングしたsINAを5.0μl/ウェルの容量でトランスフェクション試薬と混合し、室温で2.0分間インキュベートし、HIV-1pNL4-3プロウイルスDNAとともに2.93細胞にコトランスフェクションする。sINAトランスフェクション混合物を細胞に加えて、150μlの容積で最終sINA濃度を2.5nMとする。各sINAトランスフェクション混合物を3回のsINA処理用に3つのウェルに加える。細胞をsINAトランスフェクション混合物の逆流的存続下で37℃で24時間インキュベートする。24時間において、処理した細胞の各ウェルからRNAを調製する。まずトランスフェクション混合物を有する上清を除去して廃棄し、次に細胞を溶解し、各ウェルからRNAを調製する。処理後の標的遮伝子の発現を、標的遮伝子および標準化用に对照遮伝子(3.6B4, RNAポリメラーゼサブユニット)についてRT-PCRにより評価する。さらに、ELISAを用いてHIV-1p24ウイルス抗原レベルを測定することができる。3回の実験のデータを平均し、各処理について標準偏差を求める。標準化したデータをグラフに表し、活性なsINAによる標的mRNAの減少のパーセントをそれぞれの反応対照sINAと比較して判定する(例えば、Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 20, 500-505を参照)。

【0339】

非限定的例においては、リボクレオチドおよび3'末端ジチミシンキャップを含むsINAコンストラクト、ならびに、2'-デオキシ-2'-フルオロヒリミシンヌクレオチドおよびブリニンヌクレオチドを含み、sINAのセンス鎖が5'、および3'末端反転ヌクレオチド間結合を含む、化学的に修飾されたsINAコンストラクトをアセセイする。表1-1に記載されるさらに別の安定化化学についても同様に活性をアッセイする。これらのsINAコンストラクトを、適当なマッチした化学の反転対照と比較する。さらに、sINAコンストラクトはまた、未処理細胞、脂質およびスクランブル化sINAコンストラクトでトランスフェクションした細胞、および脂質のみでトランスフェクションした細胞(トランスフェクション対照)とも比較する。

【0340】

実施例10: 適応症

HIV研究における現在の一連の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法、およびHIV発現を制御する化合物が必要とされていることを示す。本明細書に記載されるように、本発明の核酸分子は、アッセイにおいてHIV

レベルに関連する疾病状態を診断するために用いることができる。さらに、核酸分子は、HIVレベルに関連する疾病状態を治療するために用いることができる。

【0341】

単独で、または他の療法との組み合わせで、HIV発現の調節と関連しうる特定の変性および疾患状態としては、既定されないが、後天性免疫不全症病（AIDS）および関連する疾病および状態、例えは、既定されないが、カボジ肉腫、リンパ腫、子宮頸癌、扁平上皮癌、心筋障害、リウマチ性疾患、および日和見感染、例えは、Pneumocystis jirovecii、サイトメガロウイルス、ヘルベス单纯ウイルス、ミコバクテリウム、クリプトコッカス、トキソプラズマ、進行性多発性神経障害（パホバウイルス）、ミコバクテリア、アスペルギルス、クリプトコッカス、カンジダ、クリプトスボリジア、Isospora belli、マイクロスボリジア、および細胞または組織中のHIVのレベルに関連するかそれに応答するであろう他の任意の疾病または状態が含まれる。

【0342】

HIV研究における現在の一連の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法およびHIV発現を制御しうる化合物が必要とされていることを示す。

【0343】

抗ウイルス化合物、モノクローナル抗体、化学生物、放射線療法、鎮痛剤、および/または抗炎症性化合物の使用はすべて、本発明の核酸分子（例えは、リボザイムおよびアントヒニン分子）と組み合わせるか併用しうる方法の非限定的例である。本発明の核酸分子と併用しうる抗ウイルス化合物の例としては、既定されないが、AZT（ジドブジンまたはZDVとして知られる）、ddC（zalcitabine）、ddI（ジテオキシノシン）、d4T（ stavudine）、および3TC（lamivudine）リバビリン、テルバリジン（Rescriptor）、ネビラビン（Viramune）、エフラビレンツ（Sustiva）、リトナビル（Norvir）、サクニビル（Invirase）、インジナビル（Crixivan）、アンブレニビル（Agenerase），ネルフィナビル（Viracept），および/またはロビナビル（Kaletra）が挙げられる。本発明の核酸分子と組み合わせができる慣用的な化学生物剂には、癌細胞を殺すための細胞毒性剤の種々の組み合わせが含まれる。これらの薬剤としては、既定されないが、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル、シスプラチナン、エトロキセート、シクロホスファミド、ドキソルビン、カルボプラチナン、エタロキセート、カムシタリルビンが挙げられる。当業者は、他の薬剤および薬剤化合物および療法と同様に本発明の核酸分子（例えは、リボザイム、SINNAおよびアントヒニン分子）と容易に組み合わせることができ、したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。

【0344】

実施例13：診断用途

本発明のSINA分子は、種々の応用において、例えは、臨床、工業、環境、農業およびRINA系、例えは、細胞溶解物または部分的に精製された細胞溶解物を利用することを含む。本発明のSINA分子を診断手段として使用し、疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか、または細胞において内因性のまたは外因性の（例えはウイルス）RINAの存在を検出することができる。SINA活性と標的RINAの構造との間の密接な関係により、分子のいすれの領域においても、標的RINAの構造形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載されるSINA分子は複数使用する必要がある。SINA分子による標的RINAの構造および複数使用する必要あるヌクレオチド変化をマッピングすることができる。SINA分子による標的RINAの切断を使用して、遺伝子の発現を阻害し、疾病または感染における特定の遺伝子の産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要な

な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可及性を提供することにより、疾患進行のよりよい治療につながるであろう（例えは、異なる遺伝子を標的とする多種のSINA分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせたSINA分子、SINA分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせた間欠的治療）。本発明のSINA分子の他のインヒビトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾患、感染または関連する健康状態に伴うmRNAの存在の検出が含まれる。そのようなRNAは、SINA分子で処理した後、標準的な方法論、例えは蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

【0345】

特定の例においては、標的RNAの野生型または変異型のみしか切断できないSINA分子をアッセイに使用する。第1のSINA分子（すなわち、野生型の標的RNAのみを切断するもの）を用いて試料中の変異型RNAを同定する。反応対照として、野生型およびSINA分子の相対効率および“非標的”RNA類を切断しない分子で切断し、反応におけるSINA分子の切断産物は、試料採取中の野生型および変異型RNAの分析のためのサイズマークの生成にも役立つ。したがって、それぞれの分析は2つのSINA分子、2つの基質、および1つの未知の試料を必要とし、これらを組み合わせて6つの反応を行う。切断産物の存在をRNAse保護アッセイを用いて確認し、各RNAの完全長および切断フラグメントをポリアクリルアミドゲルの1レーンで分析できるようにする。標的細胞における変異体RNAの発現および所望の表現型の変化の推定されるリスクへの洞察を得るために、必ずしも結果を定量する必要はない。その蛋白質産物が表現型（すなわち、疾患に関連するかまたは感染に関連する）の発生に関与することが示唆されるmRNAの発現はリスクを確立するのに十分である。同等の比活性のプローブを両方の標的物に使用すれば、RNAレベルの定性的比較で十分であり、初期の診断のコストが低減する。RNAレベルを定性的に比較するにしても定量的に比較するにしても、より高い変異型と野生型の比率はより高いリスクと相関関係があるであろう。

【0346】

本発明において普及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレバルを示す。本明細書において引用されるすべての参考文献は、それぞれの参考文献が個々にその全体が本明細書の一節としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0347】

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るためによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される方法および組成物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、表示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、特許請求の範囲において定義される本発明の精神の中に包含される変更および他の用途をなすであろう。

【0348】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および改良をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような改良の態様は、本発明および特許請求の範囲内である。本発明は、RNA活性を媒介する改良された活性を有する核酸コンストラクトを得るために、本明細書に記載される化学的修飾の種々の組み合わせおよび/または置換を試験することを当業者に教示する。そのような改良された活性は、改良された安定性、改良された生物利用性、および/またはRNAを媒介する細胞応答の改良された活性化を含むことができる。したがって、本明細書に記載される特定の態様は限定ではなく、当業者は、改良されたRNA活性を有するSINA分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書

に記載される修飾の特定の組み合わせを試験することを容易に理解することができる。

【0349】 本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定的に開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"...を含む" "...から本質的になる"および"..."からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いられる用語および表現は、説明の用器として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好みしい態様および任意の特徴により本発明を特定的に開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および要項が可能であり、そのような変更および要項も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0350】 さらに、発明の特徴および観点がマークッシュグループまたは他の代替グループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マークッシュグループまたは他のグループの個々のメンバーまたはサブグループに關してもまた記載されていることを認識するであろう。

【0351】

10

【表1】
表1: HIV受託番号

受託番号	名前	サンプル
AB032740	95TNH022	01 AE
AB032741	95TNH047	01 AE
AB056995	93JPNH47	01 AE
AB070332	NH25 93JPNH25T 93JPNH25T	01 AE
AB070333	NH25 93JPNH26W	01 AE
AF164485	93TH9021	01 AE
AF197338	93TH055	01 AE
AF197339	93TH055	01 AE
AF197340	90CPI1697 AF197340	01 AE
AF197341	90CPI071 AF197341	01 AE
AF259954	CIM235-2	01 AE
AF259955	CIM235-4	01 AE
AF267114	97CNG92F 97CNG92F	01 AE
AV087718	97CNGX11F	01 AE
U51188	90CF402 90CF402 CAR-E 4002	01 AE
U51189	93TH233	01 AE
U54771	CIM240	01 AE
AF362994	NP1623	01B
AV082988	TH1328 AY082988	01B
AV082988	97DCIKTB49 97DCIKTB49	01B
AV404325	HM404325	01GHKU
AB049811	97GHAG1 AB049811	02 AG
AB052867	AB052867	02 AG
AF063223	DJ263	02 AG
AF063224	DJ264	02 AG
AF107770	SE7812	02 AG
AF184155	GB29	02 AG
AF377954	CMS2885 AF377954	02 AG
AF377955	CMS3688 AF377955	02 AG
AV251058	MP1211 98SE-MP1211	02 AG
AV251057	MP1213 98SE-MP1213 98M251057	02 AG
AV286133	97CIM-MP807	02 AG
L39106	IBNG	02 AG
AF193276	KAL153-2	03 AB
AF193277	RUB9001 98FU001	03 AB
AF1414006	98BY10445 AF1414006	03 AB
AF0469337	94CY052-3 C10523	04 CPX
AF119819	97PVMY GR84	04 CPX
AF119820	97PVCH GR11	04 CPX
AF076998	V1861	05 DF
AF183253	V1310 AF193253	05 DF
AF184699	BFP90	06 CPX
A1245481	95ML84	06 CPX
A1288981	97SE1078	06 CPX
A1288982	95ML127	06 CPX
AF286226	97CNU01 C54	07 BC
AF286230	98CN009	07 BC
AX149847	C54A C54	07 BC
AX149872	C54D AX149872	07 BC
AX149771	CN1549	07 BC
AX149898	C54C	07 BC

30

20

【0352】

[表2]

AF286229	98CNCN008	08 BC
AY008715	97CQ1QX6F	08 BC
AY008716	97CQ1QX7F	08 BC
AY008717	97CQ1QX8F	08 BC
AF289548	98T2BF061	10 CD
AF289549	98T2BF071	10 CD
AF289550	98T2BF110	10 CD
AF179368	9H17	11 DX
AJ281718	M7518	11 DX
AJ281719	M7128	11 DX
AJ281720	MP1307	11 DX
AF385934	U7R123	12 BF
AF385935	U7R135	12 BF
AF385936	AFMA159	12 BF
AF408639	A32879 AF408639	12 BF
AF408640	A32899 AF408640	12 BF
AF1037219	AFMA185	12 BF
AF423756	X39 AF423756	14 BG
AF423757	X421 AF423757	14 BG
AF423758	X475 AF423758	14 BG
AF423759	X477 AF423759	14 BG
AF45006	X605 AF45006	14 BG
AF45007	X623 AF45007	14 BG
AF089669	SEE838	A
AF089671	SEE735	A
AF089673	SEE891	A
AF07771	U7E8131	A
AF193275	97BL006 AF193275	A
AF1381872	97ZU2 AF1381872	A
AF361673	97T203 AF361673	A
AF413987	98BL007 AF413987	A
AF1044895	Q23-17	A1
AF089670	SE7253	A1
M62820	U455 U455A	A1
AT1286237	U51190	A1
AT1286237	94C017.41	A2
AT286228	97CQ1QTB48	A2
U86760	ZAM1B4	A2C
AT286229	971CR004	A2D
AT3016544	97CQ1QX58	A2G
AT057166	95N121301	AC
AF071474	SEE948B	AC
AT361871	97T201 AF361871	AC
AT361876	97T208 AF361876	AC
AT381878	97T208 AF361878	AC
AF361879	97T209 AF361879	AC
U88823	92PQM019	AC
AF057162	SEE8603	ACD
AJ2716595	V11035	ACG
AF071473	SE77108	AD
AF0725701	SEE8954	AD
AJ237565	97NOGL3	ADIK
AJ04415	MAL.MALCG	ADK
AT3777939	CM53279 AF377939	AFGHLU
AT3777937	CM53299 AF377937	AG

33

AU20225	V112	AG
AR088474	9201G003	
AR192135	V1354	AGIU
AR192135	BW1217	AGJ
AU1293895	576-HM293635	AGJ
AR098972	SE6694	AU
AR04321	III-LAI	B
AR078005	ARES2-AR078005	B
AR0703837	WC001	B
AR063888	NL49W001	B
AR064394	MEC12-ADA	B
AR033819	HX82-4009-LAI	B
AR042100	MEC20	B
AR042101	MEC285	B
AR042102	MEC19-MBC018	B
AR042103	MEC254	B
AR042104	MEC398	B
AR042105	MEC038	B
AR042106	NBCC18R01 C18R01	B
AR049494	49S1C6	B
AR049495	59S1	B
AR069140	DIH2-3	B
AR070521	NL45E9-LAIHBNY5	B
AR075719	MNT0-MNT0070	B
AR068817	TWC5-LM49	B
AR146778	VH	B
AR224507	1W	B
AR225204	S6111-AR226204	B
AR225205	S6115D-AR226205	B
AR225206	S61161-AR226206	B
AR225207	S61167-AR226207	B
AR225208	S61115-AR226208	B
AR225209	S611K1-AR226209	B
AR225210	S611K5-AR226210	B
AR225211	S611	B
AR228395	WF27	B
AJ005287	89SP001 89E5061	B
AJ277445	GB8-BB-458-HM277445	B
AR075307	EHT0	B
AR031268	AR1054	B
AR031268	AR1508	B
AR031270	BOL122	B
AR032724	ARMAT3	B
AR032726	ARMA32	B
DI0112	CAM1	B
DB606B	MC01	B
DB606B	MC01	B
DB606B	PM213	B
L02317	BC-BG33	B
KU2007	SP2-LAV2-ARV2	B
KU2013	LAI-BRU	B
KU2013	PV22	B
KU3555	HXB2-HXBCCG-HXB2R-LAI	B
L13183	BC-BG33	B
M15554	TH45A-LAI	B
M17449	BH102-BH10	B
MNCG MN		B

【表4】

M17451		RIP HAT3	B
M19821	NL43 pNL43 NL43		B
M26727	OY1_397		B
M28429	JRCS-JR-CSF		B
M28431	NYECG		B
M32358	YU2-102X		B
M32359	YU10		B
NC_001802	HX22R		B
U12055	UW123		B
U21135	WEAU160 GHOSH		B
U23487	contaminant MANC		B
U26566	WE27		B
U26942	NL4-3 LA1/NY5 pNL43 NL43		B
U34604	HU3202A12-ACH3202A12		B
U37270	3202A21 AC13202A21		B
U59352	C18 MBC		B
U59358	P898-89-6		B
U63198	D31		B
U63191	HAN		B
U63632	JRF-JR-FL		B
U69554	85V/CJPR54		B
U69555	WCJPR854		B
U69558	WCJPR8546		B
U69587	WCJPR8552		B
U69588	WCJPR855		B
U69589	WCJPR9011		B
U69590	WCJPR9012		B
U69591	WCJPR9018		B
U69592	WCJPR9031		B
U69593	WCJPR9032		B
U71182	R142		B
X01782	REHFLV13 LA1_11IB		B
Z11530	F1-20G		B
AF323867	A027 AF332867		BF
AF408826	A025 AF408626		BF
AF408827	A047 AF408627		BF
AF408828	A053 AF408628		BF
AF408831	A055 AF408631		BF
AF408832	A32878 AF408632		BF
AY037286	ARH1014		BF
AY037287	ARO1003		BF
AY037271	BOL137		BF
AY037272	URTR17		BF
AY037273	ARMA082		BF
AY037275	ARMA036		BF
AY037276	ARMA070		BF
AY037277	ARMA037		BF
AY037278	ARMA008		BF
AY037280	ARMA097		BF
AY037281	ARMA038		BF
AY037283	ARMA029		BF
AY035495	SSB RU29-4		BF
AF423755	X2514-F423755		BF
AB238014	93N101		C
AT057154	93N1989 301999		C

2

AF-0587155	951BN1068	C
AF-057157	931BN194-301904	C
AF-057158	931BN1905	C
AF-057159	941BN1246	C
AF-10959	98BNW01B03 98BNW01B03	C
AF-10960	98BNW01B21	C
AF-10961	98BNW01B22	C
AF-10962	98BNW0412	C
AF-10963	98BNW0407	C
AF-10964	98BNW0408	C
AF-10965	98BNW0409	C
AF-10966	98BNW0410	C
AF-10967	98BNW0502	C
AF-10968	98BNW0504	C
AF-10969	98BNW1104	C
AF-10970	98BNW1105	C
AF-10971	98BNW11801	C
AF-10972	98BNW1210	C
AF-10973	98BNW15803	C
AF-10974	98BNW15005	C
AF-10975	98BNW15005	C
AF-10976	98BNW15801	C
AF-10977	98BNW16014	C
AF-10978	98BNW1626	C
AF-10979	98BNW17409	C
AF-11080	98BNW17803	C
AF-11081	98BNW17805	C
AF-286223	94BN1476	C
AF-286224	962BN1651	C
AF-286225	962BN1751	C
AF-286227	972BN012	C
AF-286228	988BN004	C
AF-286231	98BN0112	C
AF-286232	98BN0022	C
AF-286233	98BN0022	C
AF-286234	981T2013	C
AF-286235	98T2017	C
AF-2801027	96BNW01B151 98BNW00-H51	C
AF-2801028	96BNW01B654	C
AF-2901029	96BNW01B029	C
AF-2901030	96BNW01B122 AF-2901030	C
AF-321523	MA14	C
AF-361874	97T204 AF-361874	C
AF-361875	97T205 AF-361875	C
AF-443074	98BNW015	C
AF-443075	98BNW01082 AF-443075	C
AF-443076	98BNW01C122 AF-443076	C
AF-443077	98BNW01C143 AF-443077	C
AF-443078	98BNW01C144 AF-443078	C
AF-443079	98BNW01C145 AF-443079	C
AF-443080	98BNW01D1805 AF-443080	C
AF-443081	98BNW01D0545 AF-443081	C
AF-443082	98BNW01D0546 AF-443082	C
AF-443083	98BNW139212 AF-443083	C
AF-443084	99BNW16424 AF-443084	C

[表 6]

AF443085	98BMW47458 AF443085	C	AF061641	H18793-12-1	G
AF443086	98BMW47547 AF443086	C	AF061642	SE665 06165	G
AF443087	98BMWMC69 AF443087	C	AF084986	DRCL	G
AF443088	00BMW107621 AF443088	C	AF423760	X558 AF423760	G
AF443089	00BMW1076320 AF443089	C	AF450098	X138 AF450098	G
AF443090	00BMW1087421 AF443090	C	U88828	S2NG5083 JV10832	G
AF443091	00BMW147127 AF443091	C	AF005346	900CF-036 900CR056	H
AF443092	00BMW16162 AF443092	C	AF190127	V1991	H
AF443093	005WV16868 00BWV19858 AF443093	C	AF190128	V1997	H
AF443094	00BWV117593 AF443094	C	AF062394	SE787 SE92809	J
AF443095	00BWV117732 AF443095	C	AF062395	SE7022 SE8173	J
AF443096	00BWV117835 AF443096	C	AF1249235	EOTBT1C 9727-EOTBT1C	K
AF443097	00BWV117958 AF443097	C	AF1249239	MP535 96CMAMPS5C	K
AF443098	00BWV118113 AF443098	C	AF1239033	97GA-AMP84M/O	MO
AF443099	00BWV118595 AF443099	C	AF100022	YB50	N
AF443100	00BWV118602 AF443100	C	AF1271370	YBF105	N
AF443101	00BWV192113 AF443101	C	AF407418	VAU AF407418	O
AF443102	005WV210361 AF443102	C	AF407419	VAU AF407419	O
AF443103	00BWV210535 AF443103	C	AF1302646	SEMP1289 HM392646	O
AF443104	005WV210572 AF443104	C	AF1302647	SEMP1300 HM392647	O
AF443105	00BWV2127214 AF443105	C	AF120571	WTF5180	O
AF443106	00BWV21283 AF443106	C	AF407417	ANT70	O
AF443107	00BWV22167 AF443107	C	NC 002287	SEMP1289 NC 002287	O
AF443108	00BWV38193 AF443108	C	AF286236	83CD003 23 AF286236	U
AF443109	005WV38428 AF443109	C	AF457101	90CD121E12 AF457101	U
AF443110	00BWV38713 AF443110	C	AF046058	GR303 98GR303 AV046058	U
AF443111	00BWV38769	C			
AF443112	00BWV38858	C			
AF443113	00BWV38916	C			
AF443114	00BWV39702	C			
AF443115	00BWV50311	C			
AF443116	DU151 AF1043173	C			
AF443117	DU179 AF1043174	C			
AF443118	DU422 AF1043175	C			
AF443119	CTSC2 AF1043176	C			
U446016	ETH2220 C2220	C			
U52953	92BB925	C			
AT361877	97TZ7 AF361877	CD			
AV074981	00BMWMO51 AV074981	CD			
AF133821	MB32059	D			
A1320464	HM320484	D			
K03454	EL1	D			
M22633	2226 Z2 CDC-234	D			
M27923	NDK	D			
U88822	842B1055	D			
A1249238	MP411 98FFMP411	F1			
U88824	94UG1141	D			
K03454	EL1	D			
M22633	2226 Z2 CDC-234	D			
AF077336	V1850	F1			
A1249238	MP411 98FFMP411	F1			
A1377956	CM35857 AF377956	F2			
A1249238	MP255 95CMMP255	F2			
A1249237	MP257 98CMMP257C	F2			
AF078475	V1126	F2KU			
AF081840	HM88733-1-1	G			

[表 7]

AF061641	H18793-12-1	G	AF061641	H18793-12-1	G
AF061642	SE665 06165	G	AF061642	SE665 06165	G
AF084986	DRCL	G	AF084986	DRCL	G
AF423760	X558 AF423760	G	AF423760	X558 AF423760	G
AF450098	X138 AF450098	G	AF450098	X138 AF450098	G
U88828	S2NG5083 JV10832	G	U88828	S2NG5083 JV10832	G
AF005346	900CF-036 900CR056	H	AF005346	900CF-036 900CR056	H
AF190127	V1991	H	AF190127	V1991	H
AF190128	V1997	H	AF190128	V1997	H
AF062394	SE787 SE92809	J	AF062394	SE787 SE92809	J
AF062395	SE7022 SE8173	J	AF062395	SE7022 SE8173	J
AF1249235	EOTBT1C 9727-EOTBT1C	K	AF1249235	EOTBT1C 9727-EOTBT1C	K
AF1249239	MP535 96CMAMPS5C	K	AF1249239	MP535 96CMAMPS5C	K
AF1239033	97GA-AMP84M/O	MO	AF1239033	97GA-AMP84M/O	MO
AF100022	YB50	N	AF100022	YB50	N
AF1271370	YBF105	N	AF1271370	YBF105	N
AF407418	VAU AF407418	O	AF407418	VAU AF407418	O
AF407419	VAU AF407419	O	AF407419	VAU AF407419	O
AF1302646	SEMP1289 HM392646	O	AF1302646	SEMP1289 HM392646	O
AF1302647	SEMP1300 HM392647	O	AF1302647	SEMP1300 HM392647	O
AF120571	WTF5180	O	AF120571	WTF5180	O
AF407417	ANT70	O	AF407417	ANT70	O
NC 002287	SEMP1289 NC 002287	O	NC 002287	SEMP1289 NC 002287	O
AF286236	83CD003 23 AF286236	U	AF286236	83CD003 23 AF286236	U
AF457101	90CD121E12 AF457101	U	AF457101	90CD121E12 AF457101	U
AF046058	GR303 98GR303 AV046058	U	AF046058	GR303 98GR303 AV046058	U

[0 3 5 8]

表 II: HIV siRNA および標的配列

【0 3 5 9】

標的配列	配列番号	上側配列	配列番号	下側配列	配列番号
UUUGGAAAGGACCAGCAA	1	UUUGGAAAGGACCAGCAA	1	UUUGCUGGUCCUUUCCAAA	739
CAGGACAGAUGAUACAGU	2	CAGGACAGAUGAUACAGU	2	ACUGUAUCAUUCUGCUCCUG	740
AGAAAAGGGGGAUUGGGG	3	AGAAAAGGGGGAUUGGGG	3	CCCCAUCCCCCUUUUCU	741
GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	UAAUCCUCAUCCUGUCUAC	742
ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	CUGUAUCAUUCUGCUCCUGU	743
GAAAAGGGGGAUUGGGG	6	GAAAAGGGGGAUUGGGG	6	CCCCCAAUCCCCCUUUUCU	744
UUAGAUACAGGAGCAGAUG	7	UUAGAUACAGGAGCAGAUG	7	CAUCUGCUCCUGUAUCUA	745
UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	UCAUCUGCUCCUGUAUCUA	746
AGCAGAAGACAGUGGCAAU	9	AGCAGAAGACAGUGGCAAU	9	AUUGCCACUGUGUUCUCLGU	747
AUUAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUUAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUCUGCUCCUGUAUCUA	748
AUACAGGAGCAGAUACAU	11	AUACAGGAGCAGAUACAU	11	GUUAUCAUCUGCUCCUGUA	749
GAGCAGAAAGACAGUGGCAA	12	GAGCAGAAAGACAGUGGCAA	12	UUGCCACUGUCUUCUGCUC	750
AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	UGCCACUGUCUUCUGCUC	751
GCAGAACAGACAGUGGCAAU	14	GCAGAACAGACAGUGGCAAU	14	CAUUGCCACUGUCUUCUGC	752
AGAUACAGGAGCAGAUGAU	15	AGAUACAGGAGCAGAUGAU	15	AUCAUCUGCUCCUGUAUCU	753
UACAGGAGCAGAUCA	16	UACAGGAGCAGAUCA	16	UGUAUCAUCUGCUCCUGUA	754
UAUUAGAUACAGGAGCAGA	17	UAUUAGAUACAGGAGCAGA	17	UCUGCUCCUGUAUCUAUA	755
GAUACAGGAGCAGAUGUA	18	GAUACAGGAGCAGAUGUA	18	UAUCAUCUGCUCCUGUAUC	756
AUGGAAACAGAUGGCGAGG	19	AUGGAAACAGAUGGCGAGG	19	CCUGCCACUGUGUUCUCCAU	757
GUCAACAUAAUUGGAAGAA	20	GUCAACAUAAUUGGAAGAA	20	UUCUUCCAAAUUAUGUUGAC	758
UAUGGAAAACAGAUGGCAG	21	UAUGGAAAACAGAUGGCAG	21	CUGCCACUGUGUUCUCCAU	759
AUGAUAGGGGGAAUUGGAG	22	AUGAUAGGGGGAAUUGGAG	22	CCCAAAUUCCCCCUAUCAU	760
CAGAACAGUGGCAUAUGA	23	CAGAACAGUGGCAUAUGA	23	UCAUUGCCACUGUCUUCUG	761
CAAUGGCCAUUGACAGAAG	24	CAAUGGCCAUUGACAGAAG	24	CUUCUGUCAUUGGCCAUUUG	762
UCAACAUAAUUGGAAGAAA	25	UCAACAUAAUUGGAAGAAA	25	UUUCUUCCAAAUUAUGUUGA	763
AAUGGCCAUUGACAGAAGA	26	AAUGGCCAUUGACAGAAGA	26	UCUUCUGUCAAUUGGCCAUU	764
UGAUAGGGGGAAUUGGAGG	27	UGAUAGGGGGAAUUGGAGG	27	CCUCCAAUUCCCCCUAUC	765
GACAGGCCAUUUUUUJAGG	28	GACAGGCCAUUUUUUJAGG	28	CCUAAAAAAUUAUGCCUGUC	766
AUUUUCGGGUUUUAUACAG	29	AUUUUCGGGUUUUAUACAG	29	CUGUAUAAAACCCGAAAU	767
CUAUUAGAUACAGGAGCAG	30	CUAUUAGAUACAGGAGCAG	30	CUGCCUCUGUAUCUAUAG	768

40

30

20

10

【0 3 6 0】

AGACAGGCCUAUUUUUUUAG	31	AGACAGGCCUAUUUUUUUAG	31	CUAAAAAAUUAUGCCUGUCU	769
AAAUGAUAGGGGGAAUUGG	32	AAAUGAUAGGGGGAAUUGG	32	CCAAUUCCCCCUAUCAUU	770
UAUGGGCAAGCAGGGAGCU	33	UAUGGGCAAGCAGGGAGCU	33	AGCUCCUCUGCUUUGCCCAU	771
UAGUAUGGGCAAGCAGGG	34	UAGUAUGGGCAAGCAGGG	34	UCCUCUGCUUUGCCCAUACUA	772
GAAAACAGAUGGCAAGGUGA	35	GAAAACAGAUGGCAAGGUGA	35	UCACCUUGCCACUCUGUUUUC	773
ACCAUCAUAGGGAAGCUG	36	ACCAUCAUAGGGAAGCUG	36	CAGCUCCUCUAUUGGGU	774
AAUGAUAGGGGGAAUUGGA	37	AAUGAUAGGGGGAAUUGGA	37	UCCAAUUCCCCCUAUCAU	775
UGGAAAACAGAUGGCAGGU	38	UGGAAAACAGAUGGCAGGU	38	ACCUGCCACUCUGUUUUC	776
GGAAAACAGAUGGCAGGUG	39	GGAAAACAGAUGGCAGGUG	39	CACCUUGCCACUGUUUUC	777
GAUUAUGGAAAACAGAUGG	40	GAUUAUGGAAAACAGAUGG	40	CCAUUCUGUUUUCUAUACU	778
AAAUGAUAGGGGGAAUUG	41	AAAUGAUAGGGGGAAUUG	41	CAAUUCCCCCUAUCAUJJ	779
UGGAAAAGGUAGGGGGCAG	42	UGGAAAAGGUAGGGGGCAG	42	CUGCCUCUUCACCUUUC	780
AUCAUAGGGAAGCUGCAG	43	AUCAUAGGGAAGCUGCAG	43	CUGCAGCUUCCUCAUJGAU	781
UGGAAACCAAAUAGGUAUG	44	UGGAAACCAAAUAGGUAUG	44	CUAUCAUJJJJJUGGUUUC	782
CCAUCAUAGGGAAGCUGC	45	CCAUCAUAGGGAAGCUGC	45	GCAGCUUCCUCUAUJGAUG	783
AGGGAUUAUGGAAAACAGA	46	AGGGAUUAUGGAAAACAGA	46	UCUGUUUUCUAUACCUU	784
GGAACACCAAAUAGGUAUGG	47	GGAACACCAAAUAGGUAUGG	47	CCUAAUCAUJJJJUGGUUUC	785
UAGGGGGAAUJUGGAGGUU	48	UAGGGGGAAUJUGGAGGUU	48	AAACCUCCAAUUCCCCCUA	786
UACAGUGCAGGGGGAAAGAA	49	UACAGUGCAGGGGGAAAGAA	49	UUCUUCCCCCUGCAUGUA	787
CUCUAAUAGAUACAGGAGC	50	CUCUAAUAGAUACAGGAGC	50	GCUCUGUAUCUAAUAGAG	788
GGAUUAUGGAAAACAGAUG	51	GGAUUAUGGAAAACAGAUG	51	CAUCUGUUUUCUAUACU	789
CCAAAAAAUAGGAGGGGAA	52	CCAAAAAAUAGGAGGGGAA	52	UUCCCCCUAUCAUJJJJUG	790
AUGGAAACCAAAUAGUAU	53	AUGGAAACCAAAUAGUAU	53	UAUCAUJJJJJUGGUUUC	791
CAGUGCAGGGGGAAAGAAU	54	CAGUGCAGGGGGAAAGAAU	54	UAUUCUUCCCCCUGCAUG	792
ACAAUUGGCCAUUGACAGC	55	ACAAUUGGCCAUUGACAGC	55	UUCUGUCAUJGGCCAUUGU	793
CCAUUGCAUGGACAAGUAGA	56	CCAUUGCAUGGACAAGUAGA	56	UCUACUUGGUCAUGCAUGG	794
AUUAUGGAAAACAGAUGGC	57	AUUAUGGAAAACAGAUGGC	57	GCCAUUCUGUUUUCUAUAA	795
AAACAUGGCCAUJUGACAGA	58	AAACAUGGCCAUJUGACAGA	58	UCUGUCAUJGGCCAUUGU	796
AAAAAUGAUAGGGGGAAUJ	59	AAAAAUGAUAGGGGGAAUJ	59	AAUUCCCCCUAUCAUJJ	797
GCCAUUGCAUGGACAAGUAG	60	GCCAUUGCAUGGACAAGUAG	60	CUACUUGGUCAUGCAUGC	798
UAGCAGGAAGAUGGCCAGU	61	UAGCAGGAAGAUGGCCAGU	61	ACUGGCCACUUCUGCUUA	799
CAAAAAGUGAUAGGGGGAAU	62	CAAAAAGUGAUAGGGGGAAU	62	AUUCCCCCUAUCAUJJJJUG	800
AAGAAAUAGAUAGCAGCAUG	63	AAGAAAUAGAUAGCAGCAUG	63	CAUCUGUCAUCAUJJJJUU	801
UCUAAUJAGAUACAGGAGC	64	UCUAAUJAGAUACAGGAGC	64	UGCCUCUGUAUCUAAUAGA	802
GCUCUAAUAGAUACAGGAG	65	GCUCUAAUAGAUACAGGAG	65	CUCCUGUUAUCUAAUAGAGC	803
CAGGUCAAUUUUUUAGGG	66	CAGGUCAAUUUUUUAGGG	66	UCCCUAAAAAAUAGGCCUG	804

40

30

20

10

AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	UACUGUAUCAUCUGCUCCU	805
AAACAAUGGCCAUUGACAG	68	AAACAAUGGCCAUUGACAG	68	CUGUCAUUGGCCAUUGUUU	806
CGGGGUUUAAUACAGGGACA	69	CGGGGUUUAAUACAGGGACA	69	UGUCCUCGUAAAACCCG	807
CAACAUAAUUGGAAGAAAU	70	CAACAUAAUUGGAAGAAAU	70	AUUUCUUCCAAUUAUGUUG	808
UCAAUGAGGAACUGCAGA	71	UCAAUGAGGAACUGCAGA	71	UCUGCAGCUUCCUCAUJGA	809
GGAAAGGUGAAGGGGCAGU	72	GGAAAGGUGAAGGGGCAGU	72	ACUGCCCCUJACCUUCC	810
UUUCGGGUUUAAUACAGGG	73	UUUCGGGUUUAAUACAGGG	73	CCCUGUAAAACCCGAAA	811
UCGGGUUUAAUACAGGGAC	74	UCGGGUUUAAUACAGGGAC	74	GUCCUCGUAAAACCCG	812
ACAGUGCCAGGGGAAAGAAU	75	ACAGUGCCAGGGGAAAGAAU	75	AUUCUUUCCCCUGCACUGU	813
AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AGUCUACUJUGUCCAUCAU	814
AAGCCAUCAUGGACAAGU	77	AAGCCAUCAUGGACAAGU	77	ACUUGGUCAUGCAUGGCU	815
AGCCAUCAUGGACAAGU	78	AGCCAUCAUGGACAAGU	78	UACUUGGUCAUGCAUGGCU	816
GCAUUACAGAAGGAGCA	79	GCAUUACAGAAGGAGCA	79	UGGUCCUUCUCUGUAAAUGC	817
AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AUAAAUCACUUCUCCAAU	818
AGAAAAAAUCAGUAAACAGU	81	AGAAAAAAUCAGUAAACAGU	81	ACUGUACUACUJUGUUCU	819
GAAGCCAUCAUGGACAAG	82	GAAGCCAUCAUGGACAAG	82	CUUGGUCAUGCAUGGCUUC	820
ACAGGUCAUUUUUUUAGGG	83	ACAGGUCAUUUUUUUAGGG	83	CCCUAAAUAAGCCUGU	821
GAAGAAAUGAUGACAGCAU	84	GAAGAAAUGAUGACAGCAU	84	AUGCUGUCAUCAUUUCUUC	822
UUUCGGGUUUAAUACAGGG	85	UUUCGGGUUUAAUACAGGG	85	CCGUAAAACCCGAAA	823
ACCAAAAUGAUGGGGGA	86	ACCAAAAUGAUGGGGGA	86	UCCCCCUACUJUUUJUGGU	824
GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GUUCCUGCUAUGUCAUCUUC	825
UUCGGGUUUAAUACAGGG	88	UUCGGGUUUAAUACAGGG	88	UCCCUGUAAAACCCGAA	826
AUAGGGGGAAUUGGAGGUU	89	AUAGGGGGAAUUGGAGGUU	89	AACCUCCAAUACUCCCUA	827
AGAAGAAAUGAUGACAGCA	90	AGAAGAAAUGAUGACAGCA	90	UUGCUGUCAUCAUUUCUUC	828
AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	UAUAAUUCACUUCUCCAAU	829
GGAAUGACAUJAGCAGGAA	92	GGAAUGACAUJAGCAGGAA	92	UUCCCUGCUAUGUCAUCUCC	830
AGGCUAUJUUUUUJAGGGAA	93	AGGCUAUJUUUUUJAGGGAA	93	UCCCCUAAAUAUJAGCCU	831
UUAUGGAAAACAGAUUGCA	94	UUAUGGAAAACAGAUUGCA	94	UGCCAUUCUJGUUUCCAUAA	832
GGGAUJAUUGGAAAACAGAU	95	GGGAUJAUUGGAAAACAGAU	95	AUCUGUUUUCUCCAUAAUCC	833
UAGAAGAAAUGAUGACAGC	96	UAGAAGAAAUGAUGACAGC	96	GCUGUCAUCAUUUCUUCU	834
AGCUCUAUJAGAUACAGGA	97	AGCUCUAUJAGAUACAGGA	97	UCCUGUACUJUAUJAGACU	835
GUAUUGGCAAGCAGGGAGC	98	GUAUUGGCAAGCAGGGAGC	98	GCUCCCUGCUUJGCCCCAU	836
CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	GCCAUAGGAGAUGGCCUAAG	837
GCAGGAACAUACUAGUACCC	100	GCAGGAACAUACUAGUACCC	100	GGGUACUAGUAGUUCUGC	838
GGGGAGUAGACAUAGCAGG	101	GGGGAGUAGACAUAGCAGG	101	CCUGCUAUGUCAUCUCCCC	839
UACAAUCCCCAACGUCAAG	102	UACAAUCCCCAACGUCAAG	102	CUUGACUJUUJGGGUUUGUA	840

40 30 20 10

UUCCUACAAUCCCCAAAG	103	UUCCUACAAUCCCCAAAG	103	CUUJGGGAAJUGUAGGGAA	841
AAGCUCUAUJAGAUACAGG	104	AAGCUCUAUJAGAUACAGG	104	CCUGUACUAAUJAGACUU	842
CCUAUGGCAGGAAGGAGCG	105	CCUAUGGCAGGAAGGAGCG	105	CGCUUCUUCUGCCAUAGG	843
AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	CUGCUAUGUCAUCUCCCCU	844
UCCUAUGGCAGGAAGAAGC	107	UCCUAUGGCAGGAAGAAGC	107	GCUUUCUUCUGCCAUAGGA	845
CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	GCUCUUCUUCUGAUJAGCG	846
AUCUCCUAUJAGGAGGAAGA	109	AUCUCCUAUJAGGAGGAAGA	109	UCUJCCUGCCAUJAGGAGAU	847
AGCAGGAACAUACUAGUACC	110	AGCAGGAACAUACUAGUACC	110	GGUACUAGUAGUUCUGC	848
GAACACAAAAAUGAUGAGG	111	GAACACAAAAAUGAUGAGG	111	CCCUJAUCAUUUUJUGGUUUC	849
AAACCAAAAUGAUGAGGG	112	AAACCAAAAUGAUGAGGG	112	CCCCUJAUCAUUUUJUGGUU	850
CAGAAGGAGCCACCCACA	113	CAGAAGGAGCCACCCACA	113	UGUGGGUGGGCUUCCUUCU	851
UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	GUACUAGUAGUUCUGC	852
UGCAUGGACAUGUAGACUG	115	UGCAUGGACAUGUAGACUG	115	CAGUCAUCUJUGUCCAU	853
UUAGGCAUCUCCUUAUGGC	116	UUAGGCAUCUCCUUAUGGC	116	UGGCCAUAGGAGAUGGCCUA	854
UAUUGGAGGAAGAAGGGGA	117	UAUUGGAGGAAGAAGGGGA	117	UCCGCUUCUUCUGCCAU	855
AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	UACUAGUAGUUCUGC	856
UAGACAUUAUGCAACAGA	119	UAGACAUUAUGCAACAGA	119	UCUGUUUGCUAUUAUGUCUA	857
CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	GUGGCUCCUUCUGAUAAUG	858
CUAUGGCAGGAAGAAGCGG	121	CUAUGGCAGGAAGAAGCGG	121	CCGCUUCUUCUGCCAUAG	859
GAUAGGGGGAAUJUGGAGGU	122	GAUAGGGGGAAUJUGGAGGU	122	ACCUCCAAUJUCCCCCUAUC	860
ACAAUCCCCAACGUCAAGG	123	ACAAUCCCCAACGUCAAGG	123	CCUUJACUJUUGGGGUU	861
AUUCCUACAAUCCCCAAAG	124	AUUCCUACAAUCCCCAAAG	124	UUUGGGGUUJUGUAGGGAAU	862
AACCAAAAUGAUGAGGGGG	125	AACCAAAAUGAUGAGGGGG	125	CCCCCUAAUCAUUUUUGGU	863
UCUCCUUGGCAGGAAGAA	126	UCUCCUUGGCAGGAAGAA	126	UUCUCCUUCGUUACUAGGAA	864
CAUGCAGGAACAUAGUAGC	127	CAUGCAGGAACAUAGUAGC	127	GUCUACUJUGUCCAU	865
CCUGUGUACCCACAGACCC	128	CCUGUGUACCCACAGACCC	128	GGGUUCUGGGGUACACAGG	866
CAUCAUGAGGAAGCUCGA	129	CAUCAUGAGGAAGCUCGA	129	UGCAGCUUCUCCUAAUJAG	867
GACAUJAGCAGGAACUACUA	130	GACAUJAGCAGGAACUACUA	130	UAGUAGUUCUCCUACUJAG	868
GAAAGGGUGAAGGGGGAGUA	131	GAAAGGGUGAAGGGGGAGUA	131	UACUGCCCCUUCACCUUUC	869
AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	UAGUUCUCCUGCUAUGUACU	870
GCAGAUGAUACAGUAAUJAG	133	GCAGAUGAUACAGUAAUJAG	133	CUAAUACUGUAAUCAUCUGC	871
GGAGCAGGAAGUAGUACAGUAU	134	GGAGCAGGAAGUAGUACAGUAU	134	AUACUGUAAUCAUCUGCUCC	872
CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CUAGUACUJACUJUCCCCUUGG	873
GAAGCUCUAUJAGUACAG	136	GAAGCUCUAUJAGUACAG	136	CUUGUACUAAUJAGAGCUUC	874
GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	UCCUGCUAUGUCAUCUJAG	875
CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CUGUGGGUACACAGGCAUG	876

40 30 20 10

[表 1-2]

GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	CACUGUCUUCUGCUUUC	877
ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	CUAGUAGUUCUGCUAUGU	878
CAUCUCCUAUGGCAGGAAG	141	CAUCUCCUAUGGCAGGAAG	141	CUUCUCGCAUAGGAGAUG	879
GAGCAGAUGAUAACGUAAU	142	GAGCAGAUGAUAACGUAAU	142	AAUACUGUAUCAUCUGCUC	880
AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	GGCUCUCUUCUGAUAUGCU	881
CACCGGGCAGAUGGAGAGA	144	CACCGGGCAGAUGGAGAGA	144	UCUCUCAUCUGGCCUGGU	882
GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUAGUUCUCUGCUAUGUCAC	883
AGCAGGAAGAUGGCCAGUA	146	AGCAGGAAGAUGGCCAGUA	146	UACUGGCCAUCUUCUGCU	884
GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	UACAUUCUCCCUUUGGUUCU	885
AGUAUGGGCAAGCAGGGAG	148	AGUAUGGGCAAGCAGGGAG	148	CUCCUCUGCUUUCACAUACU	886
CCUACAAUCCCCAAAGUCA	149	CCUACAAUCCCCAAAGUCA	149	UACUUUUGGGGAUUGUAGG	887
CUACAAUCCCCAAAGUCA	150	CUACAAUCCCCAAAGUCA	150	UUGACUUUUGGGGAUUGUAG	888
GCCUGUGUACCCACAGACC	151	GCCUGUGUACCCACAGACC	151	GGUCUGUGGGUACACAGGC	889
AGCAGAUGAUACAGUAAUA	152	AGCAGAUGAUACAGUAAUA	152	AAUACUGUAUCAUCUGCU	890
AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	CACUUCUCCCUUUGGUUCU	891
CCCUACAAUCCCCAAAGUC	154	CCCUACAAUCCCCAAAGUC	154	GACUUUUGGGGAUUGUAGG	892
UGACAUAGCAGGAACUACU	155	UGACAUAGCAGGAACUACU	155	AGUAUUCUCUGCUAUGUCA	893
UUACAGAAGGAGCCACCC	156	UUACAGAAGGAGCCACCC	156	GGGGUGGCUCCUUCUGUAA	894
AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AGUUCUCUGCUAUGUACU	895
GCAGGAAGAUGGCCAGUAA	158	GCAGGAAGAUGGCCAGUAA	158	UUACUGGCCAUCUUCUGC	896
UAGGCAUCUCCUAUGGCA	159	UAGGCAUCUCCUAUGGCA	159	CUGCCAUAGGAGAUGGCC	897
CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	GCUAUGUCACUUCUCCU	898
AAAGAGCAGAACAGACUGG	161	AAAGAGCAGAACAGACUGG	161	CCACUGUCUUCUGCUU	899
CUCCUAUGGCAGGAAGAAG	162	CUCCUAUGGCAGGAAGAAG	162	CUUCUCCUCUGCCAUAGGAG	900
UAUCAGAAGGAGCCACCC	163	UAUCAGAAGGAGCCACCC	163	GGGGUGGCUCCUUCUGUAA	901
AUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	AUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	GGGGUCUCCUUCUGUAAU	902
AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	UCUGUGGGUACACAGGCAU	903
AAAUAUAGUAGAUUUCAGAG	166	AAAUAUAGUAGAUUUCAGAG	166	CUCUGAAAUCUACUAAU	904
UGCAUUAAGCAGCUCGUU	167	UGCAUUAAGCAGCUCGUU	167	AAGCAGCUGCUUUAUGCA	905
AAUUAUAGUAGAUUUCAGAG	168	AAUUAUAGUAGAUUUCAGAG	168	UUCUGAAAUCUACUAAU	906
GCAUCUCCUAUGGCAGGAA	169	GCAUCUCCUAUGGCAGGAA	169	UUCUGCCAUAGGAGAUGC	907
AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	GUACUUCUCCCUUUGGUUCU	908
UCAAAAUUUUCGGGUUUU	171	UCAAAAUUUUCGGGUUUU	171	AUAAAACCCGAAAAUUUJUGA	909
CAGGGAUUGGAAGGAUCAC	172	CAGGGAUUGGAAGGAUCAC	172	GUGAUCCUUUCUCAUCU	910
GAAGGAGCCACCCACAAG	173	GAAGGAGCCACCCACAAG	173	CUUGUGGGUGGCUCCUUC	911
AAUUUUCGGGUUUUUAUACA	174	AAUUUUCGGGUUUUUAUACA	174	UGUAUUAACCCGAAAAAU	912

[0 3 6 3]

30

20

10

[表 1-3]

AGCAGGAAGGCACUAUGGGC	175	AGCAGGAAGGCACUAUGGGC	175	GCCCAUAGUGCUUCCUGCU	913
AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	UGGGUGGCUCCUUCUGAU	914
UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	CUUCUCCCUUUGGUUCUCA	915
AAGGUGAACGGGGCAGUAG	178	AAGGUGAACGGGGCAGUAG	178	ACUACUGCCCUUCUCCU	916
AAAAAAUACAGUAACAGUA	179	AAAAAAUACAGUAACAGUA	179	UACUGUACUGAUUUUJUC	917
CAAUGAGGAAGCUCGCAGAA	180	CAAUGAGGAAGCUCGCAGAA	180	UUCUGCAGCUUCCUCAUJG	918
AGAUGAUACAGUAAUAGAA	181	AGAUGAUACAGUAAUAGAA	181	UUCUAAUACUGUAUCAUCU	919
UGAGGAAGCUCGCAGAAU	182	UGAGGAAGCUCGCAGAAU	182	CCAUUCUGCAGCUUCCUCA	920
UAUUUAUAGCCCAUAAAAG	183	UAUUUAUAGCCCAUAAAAG	183	CUUUGAUGGGGUCAUAAU	921
UCACUCUUUGGCAACGACC	184	UCACUCUUUGGCAACGACC	184	GGUCGUUGCCAAAAGAGUGA	922
UGGAGAAAUAUAGUAGAUU	185	UGGAGAAAUAUAGUAGAUU	185	AAUCUACUAAUUUUCUCA	923
AGACAGGAUGAGGAUAGA	186	AGACAGGAUGAGGAUAGA	186	UCUAAUCCUCAUCCUGCU	924
AAAGGUGAACGGGCAGUAG	187	AAAGGUGAACGGGCAGUAG	187	CUACUGCCCUUCCUACCUU	925
GGCAUCUCCUAUGGCAGGA	188	GGCAUCUCCUAUGGCAGGA	188	UCCUGCCAUAGGAGAUGC	926
AAGGAGCCACCCACAAGA	189	AAGGAGCCACCCACAAGA	189	UCUUGUGGGUGGCUCCU	927
UAAAGCAGGAUGGUAUGG	190	UAAAGCAGGAUGGUAUGG	190	CCAUCCAUUCCUGGUUUA	928
GGAGAAAAUUAUAGUAGAUU	191	GGAGAAAAUUAUAGUAGAUU	191	AAAUCUACUAAUUUUCUCC	929
AAGAGCAGAACAGACUGGC	192	AAGAGCAGAACAGACUGGC	192	GCCACUGCUUCCUGCUUU	930
UCAGAACGGGACCCACAC	193	UCAGAACGGGACCCACAC	193	GUGGGGUUGGGCUUCCU	931
AGGCAUCUCCUAUGGCAGG	194	AGGCAUCUCCUAUGGCAGG	194	CCUGCCAUAGGAGAUGC	932
AGGGAUUGGAAGGAUCACC	195	AGGGAUUGGAAGGAUCACC	195	GGUGAUCCUUCUCCUACCC	933
AGGAAGCUCGCAGAAUGGG	196	AGGAAGCUCGCAGAAUGGG	196	UCCCAUUCUGCAGCUUCC	934
CUGCAUUAUAGCAGCUCGU	197	CUGCAUUAUAGCAGCUCGU	197	AGCAGCUCGUUUAUAGCAG	935
AAGGGGAGGUAUAAUACA	198	AAGGGGAGGUAUAAUACA	198	UGUAAUUAUACUGCCCUU	936
UUGACUAGGGAGGCUAGA	199	UUGACUAGGGAGGCUAGA	199	UCUJAGCCUUCGGCUAGUCAA	937
UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	GCUCUCCUUGGUUCUUAU	938
GAGGAAGCUCGCAGAAUGGG	201	GAGGAAGCUCGCAGAAUGGG	201	CCCAUUCUGCAGCUUCC	939
CAGCAGGAAGCAGUAAU	202	CAGCAGGAAGCAGUAAU	202	CCCAUAGGUUCCUGCUG	940
GGAGGCCACCCACAAGAU	203	GGAGGCCACCCACAAGAU	203	AAUCUUUGGGGUUGGCC	941
AUUAUGACCCAUAAAAGA	204	AUUAUGACCCAUAAAAGA	204	UCUJUUGUAGGGGUCAUAU	942
CAGAUGAUACAGUAAUAGA	205	CAGAUGAUACAGUAAUAGA	205	UCUAAUACUGUAUCAUCU	943
AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	UUCCCUJUUGGUUCUCAU	944
AUGAGGAAGCUCGCAGAAU	207	AUGAGGAAGCUCGCAGAAU	207	CAUCUCUGCAGCUUCCUCAU	945
UGCCUGUUAUCCACAGAC	208	UGCCUGUUAUCCACAGAC	208	GUCUGUGGGUACACAGGC	946
GAAGGGGAGGUAUAAUAC	209	GAAGGGGAGGUAUAAUAC	209	GUUAUACUACUGCCCUU	947
UCAGCAUUAUACAGAAGGAG	210	UCAGCAUUAUACAGAAGGAG	210	CUCCUUCUGUAUAAUGUGA	948

[0 3 6 4]

30

20

10

【表 14】

UUCAAAUUUUUCGGGUUUA	211	UUCAAAUUUUUCGGGUUUA	211	UAAACCGAAAAUUUJGAA	949
UCUGGAAAGGUGAAGGGC	212	UCUGGAAAGGUGAAGGGC	212	GCCCCUUCACCUUJCCAGA	950
UUAGCAGGAAGAUGGCCAG	213	UUAGCAGGAAGAUGGCCAG	213	CUGGCCAUUCUCCUGCUAA	951
GAACCAAGGGAAUGUGACA	214	GAACCAAGGGAAUGUGACA	214	UGUCACUUCCCUJGGUJC	952
AGAAGGAGGCCACCCACAA	215	AGAAGGAGGCCACCCACAA	215	UUGUGGGGUGGCUCUUCU	953
AAUGAGGAAGCUGCAGAU	216	AAUGAGGAAGCUGCAGAU	216	AUUCUGCAGCUUCUCAU	954
AAGAAAAAAUCAGUACAG	217	AAGAAAAAAUCAGUACAG	217	CUGUUACUGAUUUUUUJCUU	955
GGAAUUGGAGGUUUUJAUCA	218	GGAAUUGGAGGUUUUJAUCA	218	UGAUAAAACCUCCAUJCC	956
UACAGUUAUAGUAGGACCU	219	UACAGUUAUAGUAGGACCU	219	AGGUCCUACUAAUACUGUA	957
CCAGGAUUGGAUGGCCAA	220	CCAGGAUUGGAUGGCCAA	220	UUGGGCAUCCAUUCCUGG	958
UUCUAUGUAGAUGGGCAG	221	UUCUAUGUAGAUGGGCAG	221	CUGCCCCAUCAUAGAA	959
CAAAAUUUUCGGGUUUJAUU	222	CAAAAUUUUCGGGUUUJAUU	222	AUAAAACCCGAAAUUJUUG	960
UAGACAGGAUGAGGJAUAG	223	UAGACAGGAUGAGGJAUAG	223	CUAAUCCUCAUCCUGUCUA	961
UGACAGAAGAAAAAAA	224	UGACAGAAGAAAAAAA	224	UUUAAAUUUUUCUUCUGUCA	962
UUUAAAACAGGGACAGCAG	225	UUUAAAACAGGGACAGCAG	225	CUGCUGUCCCUGUAAUAAA	963
GGGUUUAUJACAGGGACAGC	226	GGGUUUAUJACAGGGACAGC	226	CUGUCCUCUGUAAUAAAACC	964
AGAUGGAACAAGGCCAGA	227	AGAUGGAACAAGGCCAGA	227	UCUGGGGCUUJGUUCCAU	965
CUAGCGGAGGCCUAGAAGGA	228	CUAGCGGAGGCCUAGAAGGA	228	UCCUUCUAGCCUCCGUAG	966
UGACUAGCGGAGGCCUAGAA	229	UGACUAGCGGAGGCCUAGAA	229	UUCUAGCCUCCGUAGUCA	967
GACAUAAUAGCAACAGACA	230	GACAUAAUAGCAACAGACA	230	UGUCUGUJGCUAAUJUGUC	968
GGUUUUAUJACAGGGACAGC	231	GGUUUUAUJACAGGGACAGC	231	CGUCUGUCCUGUAAUAAAACC	969
GCAGGUGAUGAUJUGUGG	232	GCAGGUGAUGAUJUGUGG	232	CCACACAAUCAUCACCUGC	970
AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	CUCCGCUUJCUUCUGCCAU	971
AGGUGAUGAUJUGUGGCGA	234	AGGUGAUGAUJUGUGGCGA	234	UGCCACACAAUCAUCACCU	972
CCACCCACAGAUJAAA	235	CCACCCACAGAUJAAA	235	UUUAAAUCUJUGUGGGUGG	973
GUAAAAAAUUGGAUGACAG	236	GUAAAAAAUUGGAUGACAG	236	CUGUCAUCCAUUUUUUJAC	974
AUAAAUGCAACAGACAUAC	237	AUAAAUGCAACAGACAUAC	237	GUAGUCUGUJGCUAUJAU	975
GAUAAUAAAGCAGCUGCUU	238	GAUAAUAAAGCAGCUGCUU	238	AAAGCAGCUGCUUUAUGC	976
GGCAGGUGAUGAUJUGUG	239	GGCAGGUGAUGAUJUGUG	239	CACACAAUCAUCACCUJCC	977
AUGAUACAGUAAUAGAAGA	240	AUGAUACAGUAAUAGAAGA	240	UCCUUCUAAUACUGUAUCAU	978
GAUGGCAGGUGAUGAUJGU	241	GAUGGCAGGUGAUGAUJGU	241	ACAAUCAUCACCUJCCAU	979
CAUAAUAGCAACAGACAAU	242	CAUAAUAGCAACAGACAAU	242	UAUGUCUGUJGCUAUJAU	980
AAAAUUUUCGGGUUUJAUUA	243	AAAAUUUUCGGGUUUJAUUA	243	UAAAUAACCCGAAAUUJUU	981
ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	AUGUCUGUJGCUUUUAUGU	982
AUJUCAAAAUJUGGCCUG	245	AUJUCAAAAUJUGGCCUG	245	CAGGCCAAUJUUJUJUGAAA	983
CUGGAAAGGUGAAGGGC	246	CUGGAAAGGUGAAGGGC	246	UGCCCCUUCACCUUJCCAG	984

40

30

20

10

【表 15】

AAAACAGAUGGCAGGUGAU	247	AAAACAGAUGGCAGGUGAU	247	AUCACCUGCCACUJGUUUU	985
UUUCAAAAUUUGGGCUGA	248	UUUCAAAAUUUGGGCUGA	248	UCAGGCCAAUJUUJUGAAA	986
GAGAGAACCAAGGGGAAGU	249	GAGAGAACCAAGGGGAAGU	249	ACUUCCCCUCUGGUUCUC	987
CUCUGGAAAGGUGAAGGGG	250	CUCUGGAAAGGUGAAGGGG	250	CCCCUUCACCUUJCCAGA	988
AUJACAGGAAGAUGGCCA	251	AUJACAGGAAGAUGGCCA	251	UGGCCAUUCUCCUGCUAU	989
GAGCCACCCCACAAGAUU	252	GAGCCACCCCACAAGAUU	252	AAAUCUJUGGGGGUGGC	990
CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	ACUAGUJGCUUCCUGCUAUG	991
UUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	UUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	CCCCCCUUJCUUUUAAA	992
GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	CUCUCCUUCUAGCCUC	993
CAGUAAUAGUJAGGACCUAC	256	CAGUAAUAGUJAGGACCUAC	256	GUAGGUCCUACUAAUACUG	994
AGGGGGAAUJUGGGGUUU	257	AGGGGGAAUJUGGGGUUU	257	AAAACCUCCAAUJCCCCU	995
ACAGUAAUAGUAGGACCUA	258	ACAGUAAUAGUAGGACCUA	258	UAGGUCCUACUAAUACUGU	996
GACUAGCGGAGGUAGAAG	259	GACUAGCGGAGGUAGAAG	259	CUUCUAGCCUCCGUAGUC	997
GUUUUAUACAGGGACAGCA	260	GUUUUAUACAGGGACAGCA	260	UGUCGUCCUCUGUAAUAAA	998
CAGGUGAUGAUJUGUGG	261	CAGGUGAUGAUJUGUGG	261	GCCACACAAUCAUCACCU	999
AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	UCUCCUUCUAGCCUC	1000
UCUAUGUAGAUGGGCAGC	263	UCUAUGUAGAUGGGCAGC	263	GUJCCCCCAUCUACAUAGA	1001
UAAAAAAUJUGGAUGACAGA	264	UAAAAAAUJUGGAUGACAGA	264	UCUGUCACUAAUJUUJUUA	1002
GCAGCAGGAAGCAGCUAUG	265	GCAGCAGGAAGCAGCUAUG	265	CCAUAGGUCCUCUGC	1003
UUUUAUACAGGGACAGCA	266	UUUUAUACAGGGACAGCA	266	UCUGCUGUCCCUGUUA	1004
AAACAGAUGGCAGGUGAUG	267	AAACAGAUGGCAGGUGAUG	267	CAUCACCUCUACUJGUUU	1005
AUUCAAAUAUUCGGGUUU	268	AUUCAAAUAUUCGGGUUU	268	AAACCCGAAAUAUJUUUJAU	1006
GGGGAAUJUGGGGUUUJAU	269	GGGGAAUJUGGGGUUUJAU	269	AAAACCCUCCAAUJCCCC	1007
GCCACCCCACAAGAUUUA	270	GCCACCCCACAAGAUUUA	270	UUAAAUCUJUGGGGGUGGC	1008
GAUGAUACAGUAAUAGAAG	271	GAUGAUACAGUAAUAGAAG	271	CUUCUAAJACUGUUAUCAU	1009
UAAUAGCAACAGACAUAC	272	UAAUAGCAACAGACAUAC	272	UGUAUGUCGUJGUUGCUUA	1010
GAGGCUGAAGAAGGAGAGA	273	GAGGCUGAAGAAGGAGAGA	273	UCUCUCUCCUUCUAGCCUC	1011
GUACAGUAAUAGUAGGACC	274	GUACAGUAAUAGUAGGACC	274	GGUCCUACUAAUACUGUAC	1012
UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	CUCCUUCUAGCCUC	1013
CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	UCUCUCUCCUAGCCUC	1014
GGUACAGUAAUAGUAGGAC	277	GGUACAGUAAUAGUAGGAC	277	GUCCUACUAAUACUGUACC	1015
AAAUUUUCGGGUUUJAUAC	278	AAAUUUUCGGGUUUJAUAC	278	GUAAAUAACCCGAAAUUJUU	1016
AGCAGCAGGAAGCAGCUAUG	279	AGCAGCAGGAAGCAGCUAUG	279	CAUAGUGUCGUJGUUGGU	1017
AGCCACCCCACAAGAUUUA	280	AGCCACCCCACAAGAUUUA	280	AAAUCUJUGGGGGUGGC	1018
AACCAAGGGAAUGUGACAU	281	AACCAAGGGAAUGUGACAU	281	AUGUCACUUCUCCUJGUUU	1019
AAGGGGAAGGUGACAUAGCA	282	AAGGGGAAGGUGACAUAGCA	282	UGCUAUGUCACUJCCCCU	1020

40

30

20

10

【表 1-6】

UUAAGCCAGGAUGGAUG	283	UUAAGCCAGGAUGGAUG	283	CAUCCAUUCCUGGUUUA	1021
ACUAGCGGGAGGCUAGAAGG	284	ACUAGCGGGAGGCUAGAAGG	284	CCUACUACUACUGUACUA	1022
UAGGUACAGUAAUAGUAGG	285	UAGGUACAGUAAUAGUAGG	285	CCUACUACUACUGUACUA	1023
GGGGAAUJUGGAGGUUUA	286	GGGGAAUJUGGAGGUUUA	286	UAAAACCUCAUACUCCCC	1024
AGAUGGCAAGGUGAUGAUUG	287	AGAUGGCAAGGUGAUGAUUG	287	CAAUCAUCACCUCCACU	1025
UUAACAAUUGGCCAUJUGAC	288	UUAACAAUUGGCCAUJUGAC	288	GUCAUJUGGCCAUUUGUUUA	1026
UGGCAGGUGAUGAUUGUGU	289	UGGCAGGUGAUGAUUGUGU	289	ACACAAUCAUCACCCUGCA	1027
UAAAUAUAGCAGGAAGAUG	290	UAAAUAUAGCAGGAAGAUG	290	CAUCUUCUGCUAAUUA	1028
AGGAGCCACCCACAAAGAU	291	AGGAGCCACCCACAAAGAU	291	AUCUUGUGGGUGGCUCCU	1029
GUUAUAGUAGGACCUACAC	292	GUUAUAGUAGGACCUACAC	292	GUGUAGGUCCUACUAAAC	1030
AAUCCCCAAAGUCAAGGAG	293	AAUCCCCAAAGUCAAGGAG	293	CCUCUUGACUJUJGGGAU	1031
CCAGGCCAGAUGAGAAC	294	CCAGGCCAGAUGAGAAC	294	GUUCUCUCAUCUGGCCUG	1032
CCAUUGACAGAAGAAAAAA	295	CCAUUGACAGAAGAAAAAA	295	UUUUUUUUCUUCGUCAU	1033
CAGAUGGCAAGGUGAUGAUU	296	CAGAUGGCAAGGUGAUGAUU	296	AAUCAUCACCCUGCCACU	1034
CAGAUGAGAGAACCAAGGGG	297	CAGAUGAGAGAACCAAGGGG	297	CCCCUUGGUUCUCUACU	1035
GCCAUUGACAGAAGAAAAAA	298	GCCAUUGACAGAAGAAAAAA	298	UUUUUCUUCUGCUAAUGC	1036
UAUUAGUAGGACCUACACC	299	UAUUAGUAGGACCUACACC	299	GGGUAGGUCCUACUAAU	1037
UCUCGACGCCAGGACUCGGC	300	UCUCGACGCCAGGACUCGGC	300	GCGAGGUCCUGCGUGGAGA	1038
AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	CCCCUUGGUUCUCUACU	1039
AUCCCCAAAGUCAAGGAGU	302	AUCCCCAAAGUCAAGGAGU	302	ACUCCUUGACUUUGGGAU	1040
AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	GGCCAUUCUUCUGCUAAU	1041
GGGAUJUGGAGGUUUAUC	304	GGGAUJUGGAGGUUUAUC	304	GAUAAAACCUCCAAUUC	1042
CUCGACGCCAGGACUCGGC	305	CUCGACGCCAGGACUCGGC	305	AGCCGAGGUCCUGCGUG	1043
AUGGCCAUUAGCAGAAGAA	306	AUGGCCAUUAGCAGAAGAA	306	UUCUUCUGCUAAUGGCC	1044
AAAAAUUAGCAGGAAGAUGG	307	AAAAAUUAGCAGGAAGAUGG	307	CCAUCUUCUGCUAAU	1045
ACCGAGGACUCGGCUUCU	308	ACCGAGGACUCGGCUUCU	308	AGCAAGCCAGUCCUGCG	1046
UAACAAUAGCCAUJUGAC	309	UAACAAUAGCCAUJUGAC	309	UGUAAUJGGCCAUUJG	1047
GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	UUCUGGGCUUJGUUCAU	1048
AAUGAACAAUAGUAUAAA	311	AAUGAACAAUAGUAUAAA	311	AUUUAUCUACUUGUUAU	1049
AUUGGAGGUUUAUCAAAAG	312	AUUGGAGGUUUAUCAAAAG	312	CUUJGAAUAAAACCU	1050
AGGCUJAGAAGGAGAGAGA	313	AGGCUJAGAAGGAGAGAGA	313	AUCUCUUCUUCUACU	1051
AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	GACGCUCUUCGACCCACU	1052
AGGUACAGUAAUAGUAGGA	315	AGGUACAGUAAUAGUAGGA	315	UCCUACUAAUACUGUACU	1053
GGAGGCUJAGGAGAGAG	316	GGAGGCUJAGGAGAGAG	316	CUCUCUCCUUCUAGCCU	1054
CAGGACAUAAACAAGGUAGG	317	CAGGACAUAAACAAGGUAGG	317	CCUACCUUGUUUAUGCCU	1055
AGUAUUAGUAGGACCUACA	318	AGUAUUAGUAGGACCUACA	318	UGUAGGUCCUACUAAUACU	1056

10 20 10

UUGACAGAAGAAAAAAUAA	319	UUGACAGAAGAAAAAAUAA	319	UUUUUUUUUCUUCUGUAA	1057
UGGAGAAAGUGAAUUAUUA	320	UGGAGAAAGUGAAUUAUUA	320	UAUUAUAAUCACUUCUCA	1058
CUCUCGACGCCAGGACUCGG	321	CUCUCGACGCCAGGACUCGG	321	CCGAGUCUCUGCGUCGAG	1059
AUGAACAAUAGUAUAAA	322	AUGAACAAUAGUAUAAA	322	AAUUAUAAUCACUUCUCA	1060
UGGCCAUUAGCAGAAGAAA	323	UGGCCAUUAGCAGAAGAAA	323	UUUCUUCUGUAAUGGCC	1061
UAACCCAUJUUCUACGCAU	324	UAACCCAUJUUCUACGCAU	324	AUGCCUAAAACAU	1062
UUUUAAAAGAAAAGGGGG	325	UUUUAAAAGAAAAGGGGG	325	UCCCCCCCJUUUCUJUUAAA	1063
CGACGCCAGGACUCGGCUJG	326	CGACGCCAGGACUCGGCUJG	326	CAAGCCGAGUCCUGCGUJG	1064
AUUGACAGAAGAAAAAAUAA	327	AUUGACAGAAGAAAAAAUAA	327	UAUUUUUUUCUUCUGUAAU	1065
CUAGAAGGAGAGAGAGUGG	328	CUAGAAGGAGAGAGAGUGG	328	CCCAUCUCUCCUUCUJAG	1066
UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UCUCGCUJUUCUCCUGCCA	1067
CAACCCCAAAAGUCAAGGA	330	CAACCCCAAAAGUCAAGGA	330	UCCUJGACUJUJGGGAUJG	1068
AAAUIJAAAUIUUCGGGU	331	AAAUIJAAAUIUUCGGGU	331	ACCCGAAAUIUUGAAUJU	1069
GAAUUJGGAGGUUUAUCAA	332	GAAUUJGGAGGUUUAUCAA	332	UUGAUAAAACCU	1070
GACGCAGGACUCGGCUUGC	333	GACGCAGGACUCGGCUUGC	333	GCAAGCCGAGUCCUGCGUC	1071
UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	CAUCUCUCCGCUJAGUCAAA	1072
AUAGGUACAGUAAUAGUAG	335	AUAGGUACAGUAAUAGUAG	335	CUACUAAUACUJGUAU	1073
GGCJAGAAGGAGAGAGAG	336	GGCJAGAAGGAGAGAGAG	336	CAUCUCUCCUUCUACU	1074
ACCAAGCCAGAUGAGAGAA	337	ACCAAGCCAGAUGAGAGAA	337	UUCUCUCAUCUGCCUGGU	1075
GAUGAGAGAACCAAGGGG	338	GAUGAGAGAACCAAGGGG	338	UCCCUUJGGGUUCUCAUC	1076
GGAGCAGCAGGAAACGACUA	339	GGAGCAGCAGGAAACGACUA	339	UAGUGCUUCCUGCGUCUCC	1077
UCUCUCGACGCCAGGACUCG	340	UCUCUCGACGCCAGGACUCG	340	CGAGUCUCGCGUJGGAGAGA	1078
UCCCUACAAUCCCCAAAGU	341	UCCCUACAAUCCCCAAAGU	341	ACUJGUGGGGUJUJGGGAUJG	1079
UUGGAGGUUUAUCAAGU	342	UUGGAGGUUUAUCAAGU	342	ACUJGUGJAAAACCU	1080
ACUGUACAGUAAAUAUUA	343	ACUGUACAGUAAAUAUUA	343	UUAUUAUJACUGGUACAGU	1081
AUGGCAGGUGAUGAUUGUG	344	AUGGCAGGUGAUGAUUGUG	344	CACAAUCAUCACUCC	1082
GAGGAAUAGAACAGUAGA	345	GAGGAAUAGAACAGUAGA	345	UCUACUJGUCUJUUCU	1083
AGACAAUAAUAGCAACAGAC	346	AGACAAUAAUAGCAACAGAC	346	GUCUGUJGUAUJAGU	1084
AAAUIJAGCAGGAAGUAGG	347	AAAUIJAGCAGGAAGUAGG	347	GCCACUUCUCCUGCUAAUJU	1085
UUGGAGGAAGUGAAUUAU	348	UUGGAGGAAGUGAAUUAU	348	AUAUAAUJACUUCUCCAA	1086
UCGACGCCAGGACUCGGCU	349	UCGACGCCAGGACUCGGCU	349	AAGCCGAGUCCUGCGUCGA	1087
AAAUIUCAAAUJUUCGGGU	350	AAAUIUCAAAUJUUCGGGU	350	CCCGAAAUIUUGAAUJU	1088
CAGGCCAGAUGAGAGAAC	351	CAGGCCAGAUGAGAGAAC	351	GGUUCUCUCAUCUGGCCUG	1089
UACCCAUUGUUUUCAGCAU	352	UACCCAUUGUUUUCAGCAU	352	AAUGCJGAAAACAU	1090
ACACACGCCUJGUGUACCCA	353	ACACACGCCUJGUGUACCCA	353	UGGGUACACAGGCAUGU	1091
GGCCAUUGACAGAAGAAA	354	GGCCAUUGACAGAAGAAA	354	UUUUUCUUCUGCUAAUJG	1092

10 20 10

【0 3 6 7】

40

30

【表 1-7】

UUGACAGAAGAAAAAAUAA	319	UUGACAGAAGAAAAAAUAA	319	UUUUUUUUUCUUCUGUAA	1057
UGGAGAAAGUGAAUUAUUA	320	UGGAGAAAGUGAAUUAUUA	320	UAUUAUAAUCACUUCUCA	1058
CUCUCGACGCCAGGACUCGG	321	CUCUCGACGCCAGGACUCGG	321	CCGAGUCUCUGCGUCGAG	1059
AUGAACAAUAGUAUAAA	322	AUGAACAAUAGUAUAAA	322	AAUUAUAAUCACUUCUCA	1060
UGGCCAUUAGCAGAAGAAA	323	UGGCCAUUAGCAGAAGAAA	323	UUUCUUCUGUAAUGGCC	1061
UAACCCAUJUUCUACGCAU	324	UAACCCAUJUUCUACGCAU	324	AUGCCUAAAACAU	1062
UUUUAAAAGAAAAGGGGG	325	UUUUAAAAGAAAAGGGGG	325	UCCCCCCCJUUUCUJUUAAA	1063
CGACGCCAGGACUCGGCUJG	326	CGACGCCAGGACUCGGCUJG	326	CAAGCCGAGUCCUGCGUJG	1064
AUUGACAGAAGAAAAAAUAA	327	AUUGACAGAAGAAAAAAUAA	327	UAUUUUUUUCUUCUGUAAU	1065
CUAGAAGGAGAGAGAGUGG	328	CUAGAAGGAGAGAGAGUGG	328	CCCAUCUCUCCUUCUJAG	1066
UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UCUCGCUJUUCUCCUGCCA	1067
CAACCCCAAAAGUCAAGGA	330	CAACCCCAAAAGUCAAGGA	330	UCCUJGACUJUJGGGAUJG	1068
AAAUIJAAAUIUUCGGGU	331	AAAUIJAAAUIUUCGGGU	331	ACCCGAAAUIUUGAAUJU	1069
GAAUUJGGAGGUUUAUCAA	332	GAAUUJGGAGGUUUAUCAA	332	UUGAUAAAACCU	1070
GACGCAGGACUCGGCUUGC	333	GACGCAGGACUCGGCUUGC	333	GCAAGCCGAGUCCUGCGUC	1071
UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	CAUCUCUCCGCUJAGUCAAA	1072
AUAGGUACAGUAAUAGUAG	335	AUAGGUACAGUAAUAGUAG	335	CUACUAAUACUJGUAU	1073
GGCJAGAAGGAGAGAGAG	336	GGCJAGAAGGAGAGAGAG	336	CAUCUCUCCUUCUACU	1074
ACCAAGCCAGAUGAGAGAA	337	ACCAAGCCAGAUGAGAGAA	337	UUCUCUCAUCUGCCUGGU	1075
GAUGAGAGAACCAAGGGG	338	GAUGAGAGAACCAAGGGG	338	UCCCUUJGGGUUCUCAUC	1076
GGAGCAGCAGGAAACGACUA	339	GGAGCAGCAGGAAACGACUA	339	UAGUGCUUCCUGCGUCUCC	1077
UCUCUCGACGCCAGGACUCG	340	UCUCUCGACGCCAGGACUCG	340	CGAGUCUCGCGUJGGAGAGA	1078
UCCCUACAAUCCCCAAAGU	341	UCCCUACAAUCCCCAAAGU	341	ACUJGUGGGGUJUJGGGAUJG	1079
UUGGAGGUUUAUCAAGU	342	UUGGAGGUUUAUCAAGU	342	ACUJGUGJAAAACCU	1080
ACUGUACAGUAAAUAUUA	343	ACUGUACAGUAAAUAUUA	343	UUAUUAUJACUGGUACAGU	1081
AUGGCAGGUGAUGAUUGUG	344	AUGGCAGGUGAUGAUUGUG	344	CACAAUCAUCACUCC	1082
GAGGAAUAGAACAGUAGA	345	GAGGAAUAGAACAGUAGA	345	UCUACUJGUCUJUUCU	1083
AGACAAUAAUAGCAACAGAC	346	AGACAAUAAUAGCAACAGAC	346	GUCUGUJGUAUJAGU	1084
AAAUIJAGCAGGAAGUAGG	347	AAAUIJAGCAGGAAGUAGG	347	GCCACUUCUCCUGCUAAUJU	1085
UUGGAGGAAGUGAAUUAU	348	UUGGAGGAAGUGAAUUAU	348	AUAUAAUJACUUCUCCAA	1086
UCGACGCCAGGACUCGGCU	349	UCGACGCCAGGACUCGGCU	349	AAGCCGAGUCCUGCGUCGA	1087
AAAUIUCAAAUJUUCGGGU	350	AAAUIUCAAAUJUUCGGGU	350	CCCGAAAUIUUGAAUJU	1088
CAGGCCAGAUGAGAGAAC	351	CAGGCCAGAUGAGAGAAC	351	GGUUCUCUCAUCUGGCCUG	1089
UACCCAUUGUUUUCAGCAU	352	UACCCAUUGUUUUCAGCAU	352	AAUGCJGAAAACAU	1090
ACACACGCCUJGUGUACCCA	353	ACACACGCCUJGUGUACCCA	353	UGGGUACACAGGCAUGU	1091
GGCCAUUGACAGAAGAAA	354	GGCCAUUGACAGAAGAAA	354	UUUUUCUUCUGCUAAUJG	1092

30

10

GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	AUAGUGCUUCCUGCUGCUC	1093
CUGUACCAGUAAAUAUAAA	356	CUGUACCAGUAAAUAUAAA	356	UUUAAUAAAUAUCUGGUACAG	1094
GAAAUGAUGACAGCAUGUC	357	GAAAUGAUGACAGCAUGUC	357	GACAUGCUGCAUCAUUUC	1095
CAUUGACAGAAAGAAAAAU	358	CAUUGACAGAAAGAAAAAU	358	AUUUUUJUCUUCUGUCAUG	1096
AAAUGAUGACAGCAUGUC	359	AAAUGAUGACAGCAUGUC	359	UGACAUUGCUGUCAUCAUU	1097
GCUAGAAGGAGAGAGAUGG	360	GCUAGAAGGAGAGAGAUGG	360	CCAUCUCUCCUUCUAGC	1098
UAGGGAUUAUGGAAACAG	361	UAGGGAUUAUGGAAACAG	361	CUGUUUUCCAUAAUCCUA	1099
GAAAUAUAGAUJUCAG	362	GAAAUAUAGAUJUCAG	362	CUGAAAUCUACUAAUJJUC	1100
CUACACCUGUCAACAUAAU	363	CUACACCUGUCAACAUAAU	363	AUUAUGUUGACAGGUGUAG	1101
ACAGAUGGCAAGGUGAUGAU	364	ACAGAUGGCAAGGUGAUGAU	364	AUCAUCACCUUGCCAUUCU	1102
CCACAGGGGAUGGAAAGGAU	365	CCACAGGGGAUGGAAAGGAU	365	AUCCUUCUCCAUCCUGUGG	1103
UUAGGGAUUAUGGAAACAA	366	UUAGGGAUUAUGGAAACAA	366	GUUUUUCCAUAAUCCUA	1104
AGAUGCUGCAUUAAGCAG	367	AGAUGCUGCAUUAAGCAG	367	CUGCUUUAUAGCAGCAUC	1105
AAUAGCAACAGACAJACAA	368	AAUAGCAACAGACAJACAA	368	UUGUAGUUCUGUJUGCUAU	1106
AAUUCAAAUUUUUCGGGUU	369	AAUUCAAAUUUUUCGGGUU	369	AACCCGAAAUAUJJUGAUU	1107
CAGACUCACAAUJUCAUU	370	CAGACUCACAAUJUCAUU	370	AUUGCAUAIJUGUGAGUCU	1108
UAUGCAUUAUGGAAUCAUUC	371	UAUGCAUUAUGGAAUCAUUC	371	GAAUGAUUCCUAAUJUGCAU	1109
UACACCGUGUCAACAUAAU	372	UACACCGUGUCAACAUAAU	372	AUUAUJUGUUGACAGGUGU	1110
UGGAGGAAUAUGAACAGUA	373	UGGAGGAAUAUGAACAGUA	373	UACUUGUUCUAAUJUCUCA	1111
ACCAAGGGGAUGGACAUAA	374	ACCAAGGGGAUGGACAUAA	374	AUUGCACUUCUCCCUUJUGU	1112
GAGAUGGGUGCGAGAGCGU	375	GAGAUGGGUGCGAGAGCGU	375	ACGCUCUCGCCCCAUUCU	1113
UAUAGGUACAGUUAJUGAU	376	UAUAGGUACAGUUAJUGAU	376	UACUUAUACUGUACCUUA	1114
AUUAGGGAUUAUGGAAAC	377	AUUAGGGAUUAUGGAAAC	377	GUUUUUCCAUAAUCCUAU	1115
UGGCUUGGAAAGAACUCC	378	UGGCUUGGAAAGAACUCC	378	AGGUAUUUCACAGCAGCA	1116
GAGAGAUGGGUGCGAGAGC	379	GAGAGAUGGGUGCGAGAGC	379	GCUCUCGCCCCAUUCU	1117
CCUACACCUGUCAACAUAA	380	CCUACACCUGUCAACAUAA	380	UUAUGUUGACAGGUGUAG	1118
CAGCAGUACAAAUGGAGU	381	CAGCAGUACAAAUGGAGU	381	ACUGCCAUUJUGUACUGC	1119
GGCUCUGGAAAGAACUCC	382	GGCUCUGGAAAGAACUCC	382	UAGGUAUUUCACAGCC	1120
AGAAAAUUAJUGAUJUUC	383	AGAAAAUUAJUGAUJUUC	383	UGAAAUCUACUAAUUUU	1121
GCCACCUUUGGCCUAGGUU	384	GCCACCUUUGGCCUAGGUU	384	AACACUAGGCAAGGUGGC	1122
GAUGCUGCAUUAAGCAGC	385	GAUGCUGCAUUAAGCAGC	385	GCUCUCUJAUUAUGCAGCAU	1123
GCUAUAGGUACAGUAIUAG	386	GCUAUAGGUACAGUAIUAG	386	CUAAUACUGUACCUAUJAG	1124
AACAGAUGGCAAGGUGAUGA	387	AACAGAUGGCAAGGUGAUGA	387	UCAUCACCUGCAUCUGU	1125
AUCACUCUUJUGGCAACGAC	388	AUCACUCUUJUGGCAACGAC	388	UGCGUUGCCAAAGAGUGAU	1126
ACAUGCCUGUACCCACA	389	ACAUGCCUGUACCCACA	389	UGGGGUACACAGGCAUGU	1127
ACAGCAGUACAAUJUGCAG	390	ACAGCAGUACAAUJUGCAG	390	CUGCCAUUJUGUACUGCUGU	1128

AUGCAUUAAGGAAUCAUUC	391	AUGCAUUAAGGAAUCAUUC	391	UGAAUGAUUCCUAAUGCAU	1129
AAUUGGAGGUUUUAUCAAA	392	AAUUGGAGGUUUUAUCAAA	392	UUJUGAUAAAACCUCUCAU	1130
UUGGAGGAAAUAGAACAGU	393	UUGGAGGAAAUAGAACAGU	393	ACUJGUUJUCAUUCUCCCAA	1131
AUUGGAGGAAAUAGAACAG	394	AUUGGAGGAAAUAGAACAG	394	CUUGUJUCAUUCUCCCAAU	1132
AAAAAAUUAACAAUJUCGG	395	AAAAAAUUAACAAUJUCGG	395	CCGAAAAAAUJUUUGAUUUU	1133
AGGUGAAGGGGGCAGUAGUA	396	AGGUGAAGGGGGCAGUAGUA	396	UACUACUGCCCCUUCACCU	1134
CUAUAGGUACAGUUAUAGU	397	CUAUAGGUACAGUUAUAGU	397	ACUAAUACUGUACCUAUJAG	1135
AUUAAGCCAGGAUGGUAU	398	AUUAAGCCAGGAUGGUAU	398	AUCCAUUCCUJGGCUUUAAU	1136
GGAGGAAAUAGAACAGUAG	399	GGAGGAAAUAGAACAGUAG	399	CUACUUGUUCAUUCCUCC	1137
AGCAGUACAAAUGGAGUAG	400	AGCAGUACAAAUGGAGUAG	400	UACUGCCAUUJUGUACUGU	1138
AUCAGUACAUUGGUUCUCC	401	AUCAGUACAUUGGUUCUCC	401	GGAAAGCACAUUJUGUACUGAU	1139
UAUGGGGUACCUJUGUGGA	402	UAUGGGGUACCUJUGUGGA	402	UCCACACAGGUACCCCAUA	1140
AGAGAUGGGUGUGAGAGCG	403	AGAGAUGGGUGUGAGAGCG	403	CGCUCUCGCCCCAUUCU	1141
GGUGAAGGGGCAGUAGUAA	404	GGUGAAGGGGCAGUAGUAA	404	UUACUACUGCCCCUUCACC	1142
GUGAAGGGGCAGUAGUAAU	405	GUGAAGGGGCAGUAGUAAU	405	AUUAUACUGCCCCUUCAC	1143
CGCAGGAUCGGCUUJUCUG	406	CGCAGGAUCGGCUUJUCUG	406	CAGCAAGGCCAGGUCCUGG	1144
CACAGGGCUGUACGGACCA	407	CACAGGGCUGUACGGACCA	407	GUGGGUACACGGCAUGUG	1145
GAAGAGAUGGGUGGGAGAGA	408	GAAGAGAUGGGUGGGAGAGA	408	UCUCGCACCCACUUCU	1146
UAGAAGGGAGAGAUGGGU	409	UAGAAGGGAGAGAUGGGU	409	ACCCAUUCUCUCCUUCUA	1147
CACAGGGAAUGGAAAGGAUC	410	CACAGGGAAUGGAAAGGAUC	410	GAUCUUCUCCACUCCUUG	1148
GGCAGGAAGGAAGCGGAGAC	411	GGCAGGAAGGAAGCGGAGAC	411	GUCUCGCUGUUCUCCUCC	1149
UCCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UCCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UACUCCUJUGUJUGGGGA	1150
CCUGUCAACAUAAUJUGGA	413	CCUGUCAACAUAAUJUGGA	413	UCCCAAUUJUGUJUGACAGG	1151
UAUCAGUACAAUJUGUCUUC	414	UAUCAGUACAAUJUGUCUUC	414	GAAGCACAUUJUGUACUGAU	1152
UGAAGGGGGCAGUAGUAAA	415	UGAAGGGGGCAGUAGUAAA	415	UUUUACUACUGCCCCUUCU	1153
CUCAGAUUGGUUCUJUGGA	416	CUCAGAUUGGUUCUJUGGA	416	CUUUAUJUGCAGCAUCAG	1154
ACAGGGGAUGGAAAGGAUCA	417	ACAGGGGAUGGAAAGGAUCA	417	UGAUUCCUJUCUCCUJUGU	1155
AAGAAAAGGGGGGAUGGG	418	AAGAAAAGGGGGGAUGGG	418	CCCCAUUCCCCUCCUJUCU	1156
UCAUUAAGGGAUUAUGGAAA	419	UCAUUAAGGGAUUAUGGAAA	419	UUUCCAUUACUCCUAAUGA	1157
GAAGGGAGAGAUGGGUGGC	420	GAAGGGAGAGAUGGGUGGC	420	GCACCCAUUCUCUCCUUC	1158
GUUAAAACAAUGGCCAUUGA	421	GUUAAAACAAUGGCCAUUGA	421	UCAAUUGGCCAUUGUUUAAC	1159
AUGGACAAAGUACUGUAG	422	AUGGACAAAGUACUGUAG	422	CUACAGUACUUCUCCUJUGU	1160
UAGUAGAUUUCAGAGAACU	423	UAGUAGAUUUCAGAGAACU	423	AGUUCUCUGAAAUCUACUA	1161
CUGUCAACAUAAUJUGGA	424	CUGUCAACAUAAUJUGGA	424	CUUCCAUUACUUGUGACAG	1162
GGGGCAGUAGUAAAACAAG	425	GGGGCAGUAGUAAAACAAG	425	CUUUGUUAUACUACUGCCCC	1163
CAUUAGGGAUUAUGGAAAAA	426	CAUUAGGGAUUAUGGAAAAA	426	UUUCCAUUACUCCUAAUG	1164

[表 2-0]

GAACUACUAGUACCUUCA	427	GAACUACUAGUACCUUCA	427	UGAAGGGUACUAGUAGUUC	1165
GCAGAGAGCACAUAGGGCG	428	GCAGGAAGCACAUAGGGCG	428	CGCCCAUAGUGCUUCCUGC	1166
AAGGGAGAGAUGGGUGCG	429	AAGGGAGAGAUGGGUGCG	429	CGCACCAUCUCUCCUU	1167
CAGGAUAGGAUGGCCAAA	430	CAGGAUAGGAUGGCCAAA	430	UUUGGGCCAUCCAUUCCUG	1168
GGAAAUGAACAGUAGAU	431	GGAAAUGAACAGUAGAU	431	UAUCUACUUGUUCAUUUC	1169
AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AGCUUCCUUGGUGUCUUU	1170
AUCAUUCAGCACACCAAG	433	AUCAUUCAGCACACCAAG	433	CUUGGUUGUGCUUAGAUGAU	1171
AACAAGUAGAUAAAAGAU	434	AACAAGUAGAUAAAAGAU	434	ACUAUUUUAUCAUCUUGU	1172
AGGAAAUGAACAGUAGAU	435	AGGAAAUGAACAGUAGAU	435	AUCUACUUGUUCAUUCCU	1173
GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	UCAGCAAGCCGAGUCCUGC	1174
GAUACAUUCAGCACAAACC	437	GAUACAUUCAGCACAAACC	437	GGUUGUGCUUAGAUGAUUC	1175
CCUCAGAUGCUGCAUUA	438	CCUCAGAUGCUGCAUUA	438	UUUAUAGCAGCAUCUGAGG	1176
GAUGGAAAGGAUCACCAGC	439	GAUGGAAAGGAUCACCAGC	439	GCUGGGUAGUCCUUUCCAU	1177
AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	UCGCACCCAUUCUCUCCU	1178
CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	UACAGUACUACUUGUCCAU	1179
UCAGAUGCUGCAUUAAGC	442	UCAGAUGCUGCAUUAAGC	442	GCUUUAUAGCAGCAUCUGA	1180
AUGGAGAAAAGUAGUAGAU	443	AUGGAGAAAAGUAGUAGAU	443	AUCUACUAAUUUUCUCCAU	1181
GAGAAAAGUAGUAGAUUUC	444	GAGAAAAGUAGUAGAUUUC	444	GAACUACUAAUUUUCUCC	1182
AUGACAGCAUGCAGGGAG	445	AUGACAGCAUGCAGGGAG	445	CUCCUGACAUUGCUGUCAU	1183
AGGCCAGAUGGAGAACCA	446	AGGCCAGAUGGAGAACCA	446	UGGUUCUCUCAUCUGGCC	1184
AGAGAGAUGGGUGCGAG	447	AGAGAGAUGGGUGCGAG	447	CUCUCGCACCAUCUCU	1185
ACCCAUUUUUCAGCAUUA	448	ACCCAUUUUUCAGCAUUA	448	UAAUGCUGAAAACAUUGGG	1186
GAUGACAGCAUGCAGGGAG	449	GAUGACAGCAUGCAGGGAG	449	UCCUCUGACAUUGCUGUCA	1187
AGCCAGGAUAGGAUGGCC	450	AGCCAGGAUAGGAUGGCC	450	GGGCCAUCCAUUCCUGGCC	1188
UGAUGACAGCAUGCAGGG	451	UGAUGACAGCAUGCAGGG	451	CCCUGACAUUGCUGUCA	1189
CAGGAAGCACUAUGGGCGC	452	CAGGAAGCACUAUGGGCGC	452	CGCCCAUAGUGCUUCCUG	1190
ACAGACUCAACAUAGCAU	453	ACAGACUCAACAUAGCAU	453	AUGCAUUAUGUGAGUCUG	1191
UGGAGGUUUUAUCAAGUA	454	UGGAGGUUUUAUCAAGUA	454	UACUUAUAGAAAACCUC	1192
AAGCCAGGAUAGGAUGGCC	455	AAGCCAGGAUAGGAUGGCC	455	GGCCCAUCCAUUCCUGGCC	1193
UUUUGACUAGCGGAAGCUA	456	UUUUGACUAGCGGAAGCUA	456	UAGCCUCCGCUAGUCAA	1194
CAGAUGCUGCAUUAAGCA	457	CAGAUGCUGCAUUAAGCA	457	UCCUUAUAGCAGCAUCUG	1195
UUGGGCCUGAAAAUCCUA	458	UUGGGCCUGAAAAUCCUA	458	UAUGGAAUJJUUCAGGCC	1196
GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	ACAGUCUACUUGUGCAUGC	1197
ACCUGUCAACAUAAUUGGA	460	ACCUGUCAACAUAAUUGGA	460	UCCAUAUAGUUGACAGGU	1198
CAGGAACUACUAGUACCU	461	CAGGAACUACUAGUACCU	461	AGGGUACUAGUAGUCCUG	1199
AJAGCAACAGACACUACAA	462	AJAGCAACAGACACUACAA	462	UUUGUAUGUCUGUUGCUAU	1200

[0 3 7 1]

30

20

10

[表 2-1]

GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	CUCGCACCCAUUCUCUCC	1201
ACACCUGUCAACAUAAUUG	464	ACACCUGUCAACAUAAUUG	464	CAAUUAUUGUGACAGGUGU	1202
AGAAAUGAUGACAGCAUGU	465	AGAAAUGAUGACAGCAUGU	465	ACAUGCUGUCAUCAUUCU	1203
AGAAGGGAGAGAUGGGUG	466	AGAAGGGAGAGAUGGGUG	466	CACCCAUUCUCUCCUUU	1204
AUCAUUCAGCACACAA	467	AUCAUUCAGCACACAA	467	UGGUUGUGCUUAGAUAUU	1205
CAAAAAGUJGGGCUAAAAA	468	CAAAAAGUJGGGCUAAAAA	468	UUUUUAGGCCAAUUUUUG	1206
GCAGUACAAUAGGCAGUAU	469	GCAGUACAAUAGGCAGUAU	469	AUACUGCCAUUJUGUACUGC	1207
GGGCAGUAGUAAUACAAAGA	470	GGGCAGUAGUAAUACAAAGA	470	UCUUGUAUACUACUGGCC	1208
UCAUCAAGCACAAACCAGA	471	UCAUCAAGCACAAACCAGA	471	UCUGGUUGUGCUUAGAUGA	1209
AUGAUGACAGCAUGCAGG	472	AUGAUGACAGCAUGCAGG	472	CCUGACAGCUGUCAUCAU	1210
GAACAAGUAGUAAAUAUAG	473	GAACAAGUAGUAAAUAUAG	473	CUAAUUUAUCAUCUJGUUC	1211
UGACAGCAUGCAGGGAGU	474	UGACAGCAUGCAGGGAGU	474	ACUCCUGACAUUGCUGUCA	1212
GGAAACUACUAGUACCUUC	475	GGAAACUACUAGUACCUUC	475	GAAGGGUACUAGUAGUCC	1213
CAACCUGUCAACAUAAUUGG	476	CAACCUGUCAACAUAAUUGG	476	CCAAUUAUUGUGACAGGUG	1214
GGCCAGAUGAGAGAACCAA	477	GGCCAGAUGAGAGAACCAA	477	UUGGUUCUUCUCAUCUGGCC	1215
UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGGGGUUGUGGGGUACACA	1216
GGAAUACAUUCAAGCACAAC	479	GGAAUACAUUCAAGCACAAC	479	GUUGUGCUUJUGAUAUCC	1217
CAUACAAAAGGCAGUAU	480	CAUACAAAAGGCAGUAU	480	AAUACUGCCAUUUGUACUG	1218
GCAGGAAGAAGCGGAGACA	481	GCAGGAAGAAGCGGAGACA	481	UGUCUCCGCUUUCUCCUGC	1219
AAAGCCAGGAUAGGAUGGC	482	AAAGCCAGGAUAGGAUGGC	482	GCCAUCCAUUCUCCUGC	1220
UGAACAAAGUAGUAAAUA	483	UGAACAAAGUAGUAAAUA	483	UAAUUAUACUACUUGUCA	1221
CAAAAAGUAAAUAUUCUUCG	484	CAAAAAGUAAAUAUUCUUCG	484	CGAAAUUUJUGAUAUJJUG	1222
UAGGACCUACACCUGUCAA	485	UAGGACCUACACCUGUCAA	485	UUGACAGGUGUGAGGUCCUA	1223
GCCAGAAGAGAAGAACCAAG	486	GCCAGAAGAGAAGAACCAAG	486	CUUGGUUCUUCUCAUCUGGC	1224
GACAGCUGGACUGUCAAG	487	GACAGCUGGACUGUCAAG	487	CAUUGACAGCAGCUGUCA	1225
AAAGCCACCUUUCGGCUJAGU	488	AAAGCCACCUUUCGGCUJAGU	488	ACUAGGCAAAGGGUGGUUU	1226
GAAAUGAACAGUAGUAAA	489	GAAAUGAACAGUAGUAAA	489	UUAUCUACUUGUCAUUC	1227
ACAAUUUAAAAGAAAAGG	490	ACAAUUUAAAAGAAAAGG	490	CCUUUUCUUUUAAAAGU	1228
GCUGUGGAAAAGUACCUAA	491	GCUGUGGAAAAGUACCUAA	491	UAGGUUAUCUUCACAGC	1229
UGUCAACAUAAAUGGAAGA	492	UGUCAACAUAAAUGGAAGA	492	UCUUCCAUUAUAGUUGACA	1230
AAAAAGAAAAGGGGGAUU	493	AAAAAGAAAAGGGGGAUU	493	AAUCCCCCUUUCUUCUUUA	1231
CAAUUUAAAAGAAAAGGG	494	CAAUUUAAAAGAAAAGGG	494	CCCUUUUCUUUUAAAAGU	1232
UUAGUAGAUUUCAGAGAAC	495	UUAGUAGAUUUCAGAGAAC	495	GUUCUCUGAAAUCUACUAA	1233
AAUUUUAAAAGAAAAGGG	496	AAUUUUAAAAGAAAAGGG	496	CCCCUUUUCUUUUAAAAGU	1234
UAGAACACAGACAUACAAAC	497	UAGAACACAGACAUACAAAC	497	GUUUGUAUGUCUGUUGCUA	1235
UGGAACAAGCCCAGAAGA	498	UGGAACAAGCCCAGAAGA	498	UCUUCUGGGGUUGUUC	1236

[0 3 7 2]

30

20

10

40

[表 2-2]

AGGAUGAGGAUUAAGAACAU	499	AGGAUGAGGAUUAAGAACAU	499	AUGUUCUAAUCCUCAUCCU	1237
GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	AUUCACUUCUCCAAUUGUC	1238
ACAGACCCCAACCCACAAG	501	ACAGACCCCAACCCACAAG	501	CUUGUGGGUUGGGGUCUGU	1239
CCCUAGAACUUAAGAUGC	502	CCCUAGAACUUAAGAUGC	502	GAUUUUAAAGUUCUAGGGU	1240
GAGCCAACAGCCCCACCG	503	GAGCCAACAGCCCCACCG	503	CUUGUGGGCUCGUUGGCUC	1241
AGGACCUACACCUGUCAAC	504	AGGACCUACACCUGUCAAC	504	GUUGACAGGUGUAGGUCCU	1242
UUACAAAAAUUCAAAAUUU	505	UUACAAAAAUUCAAAAUUU	505	AAAUUUUUGAUUUUUUGUA	1243
GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	UUACUUUUGAUAACCUCCU	1244
CGGGCUGUGGAAGAACUCC	507	CGGGCUGUGGAAGAACUCC	507	GGUAUCUUCUCCACAGCCAG	1245
GGAGAAGUGAAUUAUAAU	508	GGAGAAGUGAAUUAUAAU	508	UUAAUUAUUCACUUCUCC	1246
AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	CUGACAUUGCUCUCAUCAU	1247
AUCAUUAAGGAAUUAUAGG	510	AUCAUUAAGGAAUUAUAGG	510	UCCAUUAUUCUAAUAGAU	1248
UCAAAAUUUUGGGCCUAAA	511	UCAAAAUUUUGGGCCUAAA	511	UUUCAGGCCAAUUUUUGA	1249
ACCUACACCUGUCAACUA	512	ACCUACACCUGUCAACUA	512	UAUGUUGACAGGUGUAGGU	1250
GAUGAGGAUUAAGAACAU	513	GAUGAGGAUUAAGAACAU	513	CCAUGUUCUAAUCCUCAUC	1251
ACAGCUGGACUGUCAUGA	514	ACAGCUGGACUGUCAUGA	514	UCAUUGACAGGUCCAGCUGU	1252
CCCUUCAGUCUGCUCUAAU	515	CCCUUCAGUCUGCUCUAAU	515	UUAUUCAGCAGCUCUGAGGG	1253
AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	UUCUCUGAAUACUCAUAAU	1254
AGAAAGAGCAGAACAGACU	517	AGAAAGAGCAGAACAGACU	517	ACUGCUCUUCUCCUCUUCU	1255
GACCUACACCUGUCAACAU	518	GACCUACACCUGUCAACAU	518	AUGUUGACAGGUGUAGGU	1256
CACUCUUUGGCAACGCC	519	CACUCUUUGGCAACGCC	519	GGGUUGGUUGCCAAGAGUG	1257
AUGAGGAUUAACAUGGA	520	AUGAGGAUUAACAUGGA	520	UCCAUUGUUCUAAUCCUCAU	1258
AUUUUAAAAGAAAAGGGGG	521	AUUUUAAAAGAAAAGGGGG	521	CCCCCUUUUUCUUUUAAAUAU	1259
AGAACUUAAAUGCAUGGG	522	AGAACUUAAAUGCAUGGG	522	CCCAUGCAUUAAGUUCU	1260
AUCUAUCAUACAUUGGAU	523	AUCUAUCAUACAUUGGAU	523	CAUCCAUUGAUAUAGAU	1261
AUGGAACAAGCCCCAGAAG	524	AUGGAACAAGCCCCAGAAG	524	CUUCUGGGCUUGUUCAU	1262
UUUAUGACCCAUCAAAAGAC	525	UUUAUGACCCAUCAAAAGAC	525	GUCUUUUGAUGGGUCAUA	1263
CACAAUUUAAAAGAAAAG	526	CACAAUUUAAAAGAAAAG	526	CUUUCUUCUUCUUAAAUGUG	1264
GAACUUAAAUGCAUGGGU	527	GAACUUAAAUGCAUGGGU	527	ACCCAUGCAUUAAGUUC	1265
AAAAGAAAAGGGGGGAAUUG	528	AAAAGAAAAGGGGGGAAUUG	528	CAAUCCCCCUUUUCUJUUU	1266
GGAUUGAAAGGAUACCCAG	529	GGAUUGAAAGGAUACCCAG	529	GGGUUGGUUCUUCUCCAU	1267
AGGGCAGUAGUAAUACAA	530	AGGGCAGUAGUAAUACAA	530	UUGUUAUJACUACUGCCCCU	1268
AAAGGGGGGAAUUGGGGGGU	531	AAAGGGGGGAAUUGGGGGGU	531	ACCCCCCAAUCCCCCUUU	1269
AAGGGGGGAAUUGGGGGGU	532	AAGGGGGGAAUUGGGGGGU	532	UACCCCCCAAUCCCCCUU	1270
CAGGAUGAGGAUUAACAA	533	CAGGAUGAGGAUUAACAA	533	UGUUCUAAUCCUCAUCCUG	1271
AAAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	AAAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	UCUGAAUCUACUAAUJJU	1272

10

20

30

[0 3 7 3]

GAUUUGGAGGAAUAGAAC	535	GAUUUGGAGGAAUAGAAC	535	UGUUCAUUCUCCUCAUUC	1273
UACAAAAAUCAAAAUUUU	536	UACAAAAAUCAAAAUUUU	536	AAAAAUUUUGAUAUUUUUGUA	1274
AGGAACUACUAGUACCUU	537	AGGAACUACUAGUACCUU	537	AAGGGUACUAGUAGUCCU	1275
AAAAGAAAAGGGGGGAU	538	AAAAGAAAAGGGGGGAU	538	CCAAUCCCCCUUUUUUU	1276
AAAAAUJUGGAUGACAGAA	539	AAAAAUJUGGAUGACAGAA	539	UUUCUGUCAUCCAAUJJUU	1277
ACAGGAUGAGGAUUAACAU	540	ACAGGAUGAGGAUUAACAU	540	GUUCUAAUCCUCAUCCUGU	1278
ACAAUJUGGAAGUGAAU	541	ACAAUJUGGAAGUGAAU	541	AAUUCACUUCUCCAAUJGU	1279
GGAUUGAGGAUAGAACAU	542	GGAUUGAGGAUAGAACAU	542	CAUGUUCUAAUCCUCAUCC	1280
UCACCUAGAACUAAAUAU	543	UCACCUAGAACUAAAUAU	543	CAUUUAAGUUCUAGGUGA	1281
AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUGGAAUUCAGGCCCAAU	1282
AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	545	AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	545	UGGUUUUCAGGCCCAUU	1283
GGACCUACACCUGUCAACA	546	GGACCUACACCUGUCAACA	546	UGUUGACAGGUGUAGGUCC	1284
GACAGGAUGAGGAUJAGAA	547	GACAGGAUGAGGAUJAGAA	547	UUCUAAUCCUCAUCCUGU	1285
UCUAUCAUACAUUGGAU	548	UCUAUCAUACAUUGGAU	548	UCAUCAUJGUUAUGAUAGA	1286
GGAAUUGGAGGAAUAGAAC	549	GGAAUUGGAGGAAUAGAAC	549	GUUCAUUCUCCUCAUUC	1287
AAAAGGGGGGAAUUGGGGG	550	AAAAGGGGGGAAUUGGGGG	550	CCCCCCAAUCCCCCUUUU	1288
AAAAGGGGAUAGACAGAA	551	AAAAGGGGAUAGACAGAA	551	GUUUCUGUCAUCCAAUUU	1289
CAAUUUGGAAGUGAAUUA	552	CAAUUUGGAAGUGAAUUA	552	UAAUUCACUUCUCCAAUUG	1290
AUGACCAUCAAAAGACU	553	AUGACCAUCAAAAGACU	553	AAGGUUUUUGAUGGGUCAU	1291
CUUAAGCCUCAAAUAGCU	554	CUUAAGCCUCAAAUAGCU	554	AGCUUUAUUGAGGCUUAAG	1292
AGUACAAUJUGUCUCCAC	555	AGUACAAUJUGUCUCCAC	555	UGUGGAAGCACAUGUACU	1293
UUUCCGCUGGGGACUUCU	556	UUUCCGCUGGGGACUUCU	556	GGAAAGUCCCCAGCGGAAA	1294
CAGACAUACAAUCAAAGA	557	CAGACAUACAAUCAAAGA	557	UCUUUAGUJGUUAUGUCUG	1295
UUAAGCCUCAAAUAGCU	558	UUAAGCCUCAAAUAGCU	558	AAGCUUUAUJUGAGGCUAA	1296
GGACAAUJUGGAAGUGAA	559	GGACAAUJUGGAAGUGAA	559	UUCACUUCUCCAAUJGUCC	1297
GGAUUGGGGGUACAGUC	560	GGAUUGGGGGUACAGUC	560	GCACUGUACCCCCCAAUCC	1298
AAAUGGGCCUGAAAAUCC	561	AAAUGGGCCUGAAAAUCC	561	GGAUUUUCAGGCCCAUUU	1299
GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	CUGUACCCCCCAUCCCCC	1300
GGGGGGGACAUCAAGCAG	563	GGGGGGGACAUCAAGCAG	563	CUGCUUJGUAGUCCCCCAG	1301
UCCUGGCUGGGAAAGAU	564	UCCUGGCUGGGAAAGAU	564	UACUUCUCCACAGCCAGGA	1302
ACAAAAAUCAAAUUUUC	565	ACAAAAAUCAAAUUUUC	565	GAAAUUUJUGAAUUUUJGU	1303
GGGGAUJUGGGGGUACAGU	566	GGGGAUJUGGGGGUACAGU	566	ACUGUACCCCCCAUCCCC	1304
UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UGUCCCCCCCACUGGUUUUA	1305
CAGACCCCAACCCACAAGA	568	CAGACCCCAACCCACAAGA	568	UCUUGUGGGGUJUGGGGU	1306
AGGGGCAAUGGUACAUCA	569	AGGGGCAAUGGUACAUCA	569	UGAUGUACCAUJGUCCCCU	1307
AAUJUGGAGGAAUAGAACAA	570	AAUJUGGAGGAAUAGAACAA	570	UUGUUCUAAUCCUCCAAU	1308

10

20

30

[0 3 7 4]

[表 2-3]

[表 2-4]

AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	CACUAGGCAAAGGUGGUU	1309
CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	GAUAAUGCUGAAAACAUUGG	1310
AAAGAAAAAAUCAGUAAC	573	AAAGAAAAAAUCAGUAAC	573	UGUUCAGUAGUUUUUCUUU	1311
AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	UUCUGUCAUCCAAUUUUU	1312
CAGUACAAUGUGCUCCAC	575	CAGUACAAUGUGCUCCAC	575	GUGGAAGCACAUGUACUG	1313
CUUCCCGCUGGGGACUUUC	576	CUUCCCGCUGGGGACUUUC	576	GAAAGUCCCCAGCGGAAAG	1314
GCAACAGACAUACAACUA	577	GCAACAGACAUACAACUA	577	UAGUUUJUGUAUGUCUJUC	1315
UAUACCUAGAACUUUAAA	578	UAUACCUAGAACUUUAAA	578	UUUAAAAGJUCUAGGUGAU	1316
ACCCACAGACCCAAACCA	579	ACCCACAGACCCAAACCA	579	UGGGUUGGGGUUGUGGGU	1317
GAUAGAUGGAAACAGCCCC	580	GAUAGAUGGAAACAGCCCC	580	GGGGCUUJUGUCCAUCAUJC	1318
GUUUAAGCCUCAAAAAGC	581	GUUUAAGCCUCAAAAAGC	581	GCUUUUAJUGAGGCUUAGC	1319
AUUGGGGGGUACAGUGCG	582	AUUGGGGGGUACAGUGCG	582	CUGCACUGUACCCCCCAAU	1320
CCCACAGACCCAAACCA	583	CCCACAGACCCAAACCA	583	GUGGGUUGGGGUUCUGUGGG	1321
AAAUAUUGGGCUGAAAUUC	584	AAAUAUUGGGCUGAAAUUC	584	GAUUUUCAGGCCCCAAUUU	1322
CAUUCAGCACACCAAGAU	585	CAUUCAGCACACCAAGAU	585	AUCUGGUUGUGGUJUGAUG	1323
ACUULAAAUGCAUGGGUA	586	ACUULAAAUGCAUGGGUA	586	UUACCCAUAGCAUAAAAGU	1324
UAGAACUAAAAGCAUGG	587	UAGAACUAAAAGCAUGG	587	CCAUGCAUAAAAGUUCUA	1325
CUUAAAUGCAUGGGUAAA	588	CUUAAAUGCAUGGGUAAA	588	UUUACCCAUAGCAUAAAAG	1326
GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	CACUGUACCCCCAAUCC	1327
UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	AGUCUUUUGAUGGGGUCAU	1328
GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	UCGUGUGUCCGGCUUCUJC	1329
CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	AUAAUGCUGAAAACAUUGG	1330
AGGAUUGGAGGAAAGUAA	593	AGGAUUGGAGGAAAGUAA	593	UUCAUUCUCCUCAAUUCCU	1331
AGAGACAGGCUAUUUUUU	594	AGAGACAGGCUAUUUUUU	594	AAAAAAUUAJCCUGUCUCU	1332
AAGUAGAUAAAUAUCAG	595	AAGUAGAUAAAUAUCAG	595	CUGACUAAUAAAUCUACU	1333
AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	CUGAUUAUGCUGAAAACAU	1334
UUUUUGUCUGGUUAUGUGC	597	UUUUUGUCUGGUUAUGUGC	597	GCACUUAACGACAAUA	1335
AUUACAAAAAUUCAAAAU	598	AUUACAAAAAUUCAAAAU	598	AUUUJUGUAUUUUUGUAAU	1336
GCCAGGAAUGGAUGGCCA	599	GCCAGGAAUGGAUGGCCA	599	UGGGCCAUCCAUUCUGGC	1337
CCUGGCUGUGGGAAAGAUAC	600	CCUGGCUGUGGGAAAGAUAC	600	GUACUJUUCACAGCCAGG	1338
UGUUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UGUUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UCUGAUAAUGCUGAAAACA	1339
ACCUAGAACUUAAAUGCA	602	ACCUAGAACUUAAAUGCA	602	UGCAUJUAAAAGUUCUAGGU	1340
GGGAUUGGAAGGAUCACCA	603	GGGAUUGGAAGGAUCACCA	603	UGGUGAUCCUUJUCCAUCC	1341
AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	UCCAUJUUCUGGUUUUAAA	1342
AAAGGAUUUGGGAGGAAAU	605	AAAGGAUUUGGGAGGAAAU	605	CAUUCUCCUCAAUUCCUU	1343
ACUUUCGCUGGGACUUU	606	ACUUUCGCUGGGACUUU	606	AAAGUCCCAGCGGAAAGU	1344

[0 3 7 5]

30

20

10

[表 2-5]

ACAGAAGAAAAAAUAAAAG	607	ACAGAAGAAAAAAUAAAAG	607	CUUUUAUUUUUUUUUCUUGU	1345
AGCACAGACAUACAAACU	608	AGCACAGACAUACAAACU	608	AGUJUJUGUAUGUCUGUJCU	1346
UAUUGUCUGGUUAUGUGCA	609	UAUUGUCUGGUUAUGUGCA	609	UGCACUUAJCCAGACAAUA	1347
UAAAAGAAAAGGGGGGU	610	UAAAAGAAAAGGGGGGU	610	AUCCCCCCUUUUCUUUUA	1348
UGCUUAAGGCCUCAAAAAG	611	UGCUUAAGGCCUCAAAAAG	611	CUUUAUUGAGGCUUAGCA	1349
CAGGAAGAGGGCCAGUAAA	612	CAGGAAGAGGGCCAGUAAA	612	UUUACUGGCCAUUCUCCUG	1350
CCAGAAGAGGAGAACCAAGG	613	CCAGAUGAGAGAACCAAGG	613	CCUUGGUUCUCUCAUCUGG	1351
GAUJUUGGGGGGUACAGUGCA	614	GAUJUUGGGGGGUACAGUGCA	614	UGCACUGUACCCCCAAUJC	1352
AAAUGAACAGUAGAUAAA	615	AAAUGAACAGUAGAUAAA	615	UUUACUACUUCUUGUCAUU	1353
AGCCACCUUUCGCCUAGUGU	616	AGCCACCUUUCGCCUAGUGU	616	ACACUAGGCAAAGGGUGCU	1354
GACUUUCGCCUGGGGACUU	617	GACUUUCGCCUGGGGACUU	617	AAGUCCCCAGCGGAAAGUC	1355
CCAGUAAAUAUAAAAGCCAG	618	CCAGUAAAUAUAAAAGCCAG	618	CUGGUCCUUAUUUUACUGG	1356
GCAAGUAUUGCCCCUCCCA	619	GCAAGUAUUGCCCCUCCCA	619	UGGGAGGGGCAUACAUJUC	1357
AACUUAAAUGCAUGGGGU	620	AACUUAAAUGCAUGGGGU	620	UACCCAUJUAAAAGUU	1358
UUGGGGGGUACAGUGCG	621	UUGGGGGGUACAGUGCG	621	CCUGCACUGUACCCCCCAA	1359
GGACUJUUCGCCUGGGGACU	622	GGACUJUUCGCCUGGGGACU	622	AGUCCCCAGCGGAAAGUCC	1360
CUAGAACUJUAAAUGCAUG	623	CUAGAACUJUAAAUGCAUG	623	CAUGCAUJUAAAAGUUCUAG	1361
UCAGUACAAUGGCCUJUCC	624	UCAGUACAAUGGCCUJUCC	624	UGGAAGCACAUUUGUACUGA	1362
AAGGAUUUGGGAGGAAU	625	AAGGAUUUGGGAGGAAU	625	UCAUJUCCUCAAUUCCUU	1363
UACCCACAGACCCCAACCC	626	UACCCACAGACCCCAACCC	626	GGGUUGGGGUUCUGUGGGUA	1364
GAGACAGGCCUAAAUUUUU	627	GAGACAGGCCUAAAUUUUU	627	UAAAUAUJAGCCUJUC	1365
CUGGUUAAGGCCUCAAAA	628	CUGGUUAAGGCCUCAAAA	628	UUUAUJUGAGGCUUAAGCAG	1366
AGGAAGAUGGCCAGUAAA	629	AGGAAGAUGGCCAGUAAA	629	UJJUJACUGGCCAUUCUCCU	1367
AGACAUACAAUAAAAGAA	630	AGACAUACAAUAAAAGAA	630	UUCUUUAUUGGUUAUGUCA	1368
CAUGUUUUCAGCAUUAUC	631	CAUGUUUUCAGCAUUAUC	631	UGAUUAUGCUGAAAACAU	1369
UUGGAAGGAGGCCAGAAAG	632	UUGGAAGGAGGCCAGAAAG	632	CUUJUGCUGGUCCUUUCCAA	1370
GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	UCCACAUUUCACAGCC	1371
UAAAUGGAGAAAUAUAGUA	634	UAAAUGGAGAAAUAUAGUA	634	UACUAAUJUUCUCAUJUC	1372
AGGAAGAAGCGGGAGACAGC	635	AGGAAGAAGCGGGAGACAGC	635	GCUGUCUCCGGCUUCUCCU	1373
AAAAAGAAAAAAUAGCUA	636	AAAAAGAAAAAAUAGCUA	636	UACUGAUUUUUUUUUUUU	1374
AUCAGAAAAGACCUCCAUU	637	AUCAGAAAAGACCUCCAUU	637	AAUGGAGGUUCUUCUGAU	1375
AGACCCCAACCCACAAAGA	638	AGACCCCAACCCACAAAGA	638	UUCUUGGGGUUGGGGUUC	1376
CAAGUAGAUAAAUAUAGUA	639	CAAGUAGAUAAAUAUAGUA	639	UGACUAAUJUUCUACUJUC	1377
AAAGCUAAGGUACAGUAU	640	AAAGCUAAGGUACAGUAU	640	AUACUGUACCUUAUAGCUU	1378
UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	CAGCUGCUUAUAGCAGCA	1379
UUUAAAUGCAUGGGUAAA	642	UUUAAAUGCAUGGGUAAA	642	UUUACCCAUAGCAUAAA	1380

[0 3 7 6]

30

20

10

UUUCAGCAUUAUCAGAAG	643	UUUCAGCAUUAUCAGAAG	643	CUUCUGAUAAUGCUGAAA	1381
ACUGCUUAAGCCUCAUAA	644	ACUGCUUAAGCCUCAUAA	644	UUAUUGAGGCUUAGCAGU	1382
GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	AGCUUUGCUGGUCCUUUCC	1383
UGUACCAAGUAAAUAAG	646	UGUACCAAGUAAAUAAG	646	CUUUAUUUUACUGGUACA	1384
GAAGAAAAAAUAAAAGCAU	647	GAAGAAAAAAUAAAAGCAU	647	AUGCUUUAUUUUUCUUC	1385
GUGUACCCACAGACCCAA	648	GUGUACCCACAGACCCAA	648	UGGGGGUCUGUGGGUACAC	1386
GGGGGAUUGGGGGUAC	649	GGGGGAUUGGGGGUAC	649	UGUACCCCCCAAUCCCCC	1387
GGAAGAAGCGGAGACAGCG	650	GGAAGAAGCGGAGACAGCG	650	CGCUGUCUCCGCUUCUCC	1388
GAAGCGGAGACAGCGA	651	GAAGCGGAGACAGCGA	651	UCGUCGCUGUCUCCGCUJC	1389
UUAAAUGCAUGGGUAAAAG	652	UUAAAUGCAUGGGUAAAAG	652	CUUUUACCCAUGCAUUAA	1390
AACCCACUGCUUAAGCCU	653	AACCCACUGCUUAAGCCU	653	GAGGCUUAAAGCAGUGGGU	1391
GUUUUCAGCAUUAUCAGA	654	GUUUUCAGCAUUAUCAGA	654	UUCUGAUAAUGCUGAAAAC	1392
GGAUAAAUAUAUAUGUA	655	GGAUAAAUAUAUAUGUA	655	UUACUAUUUUAUJJUAUCC	1393
GUACCCACAGACCCAAACC	656	GUACCCACAGACCCAAACC	656	GGUUGGGUCUGUGGGUAC	1394
GAUAAAUAUAUAUAGUAG	657	GAUAAAUAUAUAUAGUAG	657	CUUACUUAUJJUAUJJUAU	1395
AAGCCUAAUAAGCUUGC	658	AAGCCUAAUAAGCUUGC	658	CGAACGUUUUAUJAGGCU	1396
GCAGGACAUAAACAAGUAG	659	GCAGGACAUAAACAAGUAG	659	CUACCUUUAUAGGUCCUGC	1397
CCCACUGCUUAAGCCUCA	660	CCCACUGCUUAAGCCUCA	660	UUGAGGCUUAAAGCAGUGGG	1398
GGGACUUCCCUGGGGAC	661	GGGACUUCCCUGGGGAC	661	GUCCCCACGGGAAGGUCC	1399
AUCACCUAGACUUAUAAU	662	AUCACCUAGACUUAUAAU	662	UUUAAAAGGUCAUGGUGAU	1400
UAGAGCCCUGGAGCAUCC	663	UAGAGCCCUGGAGCAUCC	663	GGAAUGCUUCCAGGGCUCUA	1401
GGGCUGUJUGGAAAUGUGGA	664	GGGCUGUJUGGAAAUGUGGA	664	UCCACAUUUCACAGGCC	1402
UUUCAGCAUUAUCAGAAG	665	UUUCAGCAUUAUCAGAAG	665	CCUUCUGAUAAUUCUGUAA	1403
UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UAGUCUJUUGAUGGGUCA	1404
AGAAAAAAUAAAAGCAUUA	667	AGAAAAAAUAAAAGCAUUA	667	UAUUGCUCUJUUAUCCCCU	1405
AGAGCGGAGACAGCAGC	668	AGAGCGGAGACAGCAGC	668	CGUCGCUGUCUCCGCUUCU	1406
AAGAAAAAAUAAAAGCAU	669	AAGAAAAAAUAAAAGCAU	669	AUGCUUUAUJJUUUUUUCU	1407
AAUGGAGAAAAAAUAGLJAGA	670	AAUGGAGAAAAAAUAGLJAGA	670	UCUACAUUUUUUCUCCAUU	1408
GCUGAACAUUCAAGACAG	671	GCUGAACAUUCAAGACAG	671	CUGUCUUAAGAUGUUCAGC	1409
AAAAAGAAAAAAUACAGUAA	672	AAAAAGAAAAAAUACAGUAA	672	UUACUGAUUUUUUCUJJUU	1410
GAACAAGCCCCAGAACGACC	673	GAACAAGCCCCAGAACGACC	673	GGUCUUCUGGGGUUGUUC	1411
GUGAUAAAUGUCAGCUAAA	674	GUGAUAAAUGUCAGCUAAA	674	UUJAGCUGACAUUAUJAC	1412
GAGCCCUGGAGACAUCCAG	675	GAGCCCUGGAGACAUCCAG	675	CUGGAUGCUUCCAGGGCUC	1413
AGUGGGGGGACAUCAGCA	676	AGUGGGGGGACAUCAGCA	676	UGCUUAGAUUCCCCCCACU	1414
GCCUGGGAGCUCUCUGGU	677	GCCUGGGAGCUCUCUGGU	677	AGCCAGAGAGGUCCCGAGG	1415
UGGAAGGGACCAAGCAAGC	678	UGGAAGGGACCAAGCAAGC	678	GUUUCUGGUCCUJUUCUCA	1416

30	20	10			
----	----	----	--	--	--

AGCAGGACAUAAACAAGGU	679	AGCAGGACAUAAACAAGGU	679	UACCUUGUUUAUGUCCUGCU	1417
CCUAGAACUUUAUAUGCAU	680	CCUAGAACUUUAUAUGCAU	680	AUGCAUUAUAAAUGUUCAGG	1418
AGUAGAUAAAUAUGUCAGU	681	AGUAGAUAAAUAUGUCAGU	681	ACUGACAUUAUUAUACUAC	1419
AAAUAAAAGCCAGGAUAGG	682	AAAUAAAAGCCAGGAUAGG	682	CCAUUCCUGGUUUUAAA	1420
AGUAAAUAUAAGCCAGGA	683	AGUAAAUAUAAGCCAGGA	683	UCCUGGCUUJUUAUJJUACU	1421
UGUGAUAAAUGUCAGCUAA	684	UGUGAUAAAUGUCAGCUAA	684	UAGCUGACAUUAUACACA	1422
AGCCCUGGAAGCAUCAGG	685	AGCCCUGGAAGCAUCAGG	685	CCUGGAUGCLUJCCAGGGCU	1423
CACUGCUUAAGCCUCAAA	686	CACUGCUUAAGCCUCAAA	686	UAUUGAGGCUUJUAGCAGUG	1424
AAAAAAUCAGUAACAGUAC	687	AAAAAAUCAGUAACAGUAC	687	GUACUGUUAUCUGAUUUUU	1425
GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	CCAGAGAGGUCCAGGGCUC	1426
UUCCGCUGGGGACUUUCCA	689	UUCCGCUGGGGACUUUCCA	689	UGGAAGGUCCCCAGCGGAA	1427
GAGAGACAGGCUUUUUU	690	GAGAGACAGGCUUUUUU	690	AAAAAUUAGCCUGUCUC	1428
GCUGUGAUAAAUGUCAGCU	691	GCUGUGAUAAAUGUCAGCU	691	AGCUGACAUUUUAUACAGC	1429
CCACAGCCCCACCCACAC	692	CCACAGCCCCACCCACAC	692	UGUGGGUJUGGGGUUGUUG	1430
CAGGAGAAAGCGGAGACAG	693	CAGGAGAAAGCGGAGACAG	693	CGUCUCCCGUUCUCCUG	1431
UAAGCCUCAAAUAGCUUG	694	UAAGCCUCAAAUAGCUUG	694	CAAGCUUUUAUJAGGCUUA	1432
AAAAAAAGAAAAAAUACAGU	695	AAAAAAAGAAAAAAUACAGU	695	ACUGAUUUUUUUCUUUUUU	1433
GACAGAAGAAAAAAUAAA	696	GACAGAAGAAAAAAUAAA	696	UUUUJUJJUUUUUCUUCUGUC	1434
GUACCAUAAAUAAGAAGC	697	GUACCAUAAAUAAGAAGC	697	GCUUUAUJUUUACUGGUAC	1435
AAAAGAAAAAAUACAGUAC	698	AAAAGAAAAAAUACAGUAC	698	GUUACUGAUUUUUUCUUUU	1436
AAAAAAUCAGUAACAGUAC	699	AAAAAAUCAGUAACAGUAC	699	AGUACUGUJUUCAGUUUUU	1437
AGAGCCCCUGGAAGCAUCC	700	AGAGCCCCUGGAAGCAUCC	700	UGGAUGCCUJUCCAGGGCUC	1438
CAGGGGCAAAUGGUACAU	701	CAGGGGCAAAUGGUACAU	701	GAUGUACAUUUJUGCCCCUG	1439
CUGCAUUAUACCAUACCUA	702	CUGCAUUAUACCAUACCUA	702	CUAGGUUAUGGUAAAUGCAG	1440
UAAAUGCAUGGGGUAAAAGU	703	UAAAUGCAUGGGGUAAAAGU	703	ACUUIUACCCAUAGCAUUA	1441
AAGUAAAACAUAGUACAGA	704	AAGUAAAACAUAGUACAGA	704	UCUGUUAUJAGGUUUACU	1442
CCACACAUAGCCUGUGUACC	705	CCACACAUAGCCUGUGUACC	705	GGUACACAGGGCAUGGUUG	1443
AGUAGAUJUUCAGAGAACU	706	AGUAGAUJUUCAGAGAACU	706	AAGUUCUCUJUUAUACUAC	1444
CAUCAGAAGAACCUCAU	707	CAUCAGAAGAACCUCAU	707	AUGGAGGUJUUCUUCUGUA	1445
ACCAGUAAAUAUAAGGCCA	708	ACCAGUAAAUAUAAGGCCA	708	UGGUUUUAUJUUUACUGGU	1446
CACAGACCCCAACCCACAA	709	CACAGACCCCAACCCACAA	709	UUGUGGGUJUGGGGUUGUUG	1447
AGGGGGGAUJUGGGGGGUAC	710	AGGGGGGAUJUGGGGGGUAC	710	GUCCCCCCCCAUCCCCCCC	1448
UGCAUUAUACCAUACCUAG	711	UGCAUUAUACCAUACCUAG	711	ACUAGGUUAUGGUAAAUGC	1449
CAAUGGACAUUAUACAUU	712	CAAUGGACAUUAUACAUU	712	AAAUUUJUGAUJUGGUCAU	1450
CUGAACAUUUAAGACAGC	713	CUGAACAUUUAAGACAGC	713	GCUGUCUUUAAGGUUCAG	1451
GCCUCAUAAAAGCUUGCCU	714	GCCUCAUAAAAGCUUGCCU	714	AGGCAAGCUUUUAUGGAGC	1452

UGUACCCACAGACCCCCAAC	715	UGUACCCACAGACCCCCAAC	715	GUUGGGGUCUGUGGGUAC	1453
GAAGUAAAACAUAGUAACAG	716	GAAGUAAAACAUAGUAACAG	716	GAAGUACAUAGGUUACUUC	1454
UGAGGACCUACACCUGCUA	717	UGAGGACCUACACCUGCUA	717	UGACAGGUAGGUAGGUCCUAC	1455
CAGUGGGGGGACAUCAGC	718	CAGUGGGGGGACAUCAGC	718	GUUAGAUGUCCCCCACUG	1456
ACCCACUGCUUAAGCCUCA	719	ACCCACUGCUUAAGCCUCA	719	UGAGGCUUAAAGCAGUGGGU	1457
AAAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AAAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AUUCUACGGGCCAAUJJUUU	1458
UGGGGGGACAUCAGCAGC	721	UGGGGGGACAUCAGCAGC	721	GCUCUJUJAGUAGCCCCCA	1459
GUACAAAUGGCAGUUAUCA	722	GUACAAAUGGCAGUUAUCA	722	UGAAUACUGCCAUUJUAC	1460
AAGCUAUAGGUACAGUAU	723	AAGCUAUAGGUACAGUAU	723	AAUACGUACCUAUAGCUU	1461
AGAAGAAAAAAUAAAAGC	724	AGAAGAAAAAAUAAAAGC	724	GCUUUUAUJJUUUJUUCUG	1462
AAAUGCAUGGUAAAAGUA	725	AAAUGCAUGGUAAAAGUA	725	UACUUUJACCAUGCAUJU	1463
AGCCUAAAAGCUUJGCGC	726	AGCCUAAAAGCUUJGCGC	726	GGCAAGCUUUAUJAGGGCU	1464
CCACUGCUUAAGCCUCAAU	727	CCACUGCUUAAGCCUCAAU	727	AUUGAGGCUUAAAGCAGUG	1465
AAGAACGGAGACAGCGAC	728	AAGAACGGAGACAGCGAC	728	GUCGCUGUCUCCGCUUCU	1466
AAAUGGAGAAAUAUJAGUAG	729	AAAUGGAGAAAUAUJAGUAG	729	CUACUAAAUCUCCUCAUJU	1467
AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	GCCAGAGGCUCCCAGGGCU	1468
AACAAGCCCCAGAACCCA	731	AACAAGCCCCAGAACCCA	731	UGGUCUUCUGGGCUUGGUU	1469
UACAGUAAAUAUJAGC	732	UACAGUAAAUAUJAGC	732	GGCUUUAUJJUUACUGGUA	1470
UUCAAAAAUUJGGGCGUGAA	733	UUCAAAAAUUJGGGCGUGAA	733	UUCAGGCCAAUJJUUUJGAA	1471
AGAAGAAAAAAUAAAAGCA	734	AGAAGAAAAAAUAAAAGCA	734	UGCUUUUAUJJUUUJUUCU	1472
CUGUGUACCCACAGACCCC	735	CUGUGUACCCACAGACCCC	735	GGGGUCUGUGGGUACACAG	1473
GCCUGUACUGGGUCUCU	736	GCCUGUACUGGGUCUCU	736	AGAGAGACCCAGUACAGGC	1474
CAGUAAAUAUAGCCAGG	737	CAGUAAAUAUAGCCAGG	737	CCUGGUUUUAUJJUUUJUG	1475
UACAAAUGGCAGUUAUCAU	738	UACAAAUGGCAGUUAUCAU	738	AUGAAUACUGCCAUUJUGA	1476

siNAコンストラクトの上側配列および下側配列の3'末端は、例えば、約1, 2, 3, または4スクレオチドの長さ、好ましくは2スクレオチドの長さのオーバーハング配列を含むことができ、下側配列のオーバーハング配列は任意に標的配列の一部と相補的であってもよい。上側配列はセンス鎖とも称され、下側配列はアンチセンス鎖とも称される。表中の上側配列および下側配列は、さらに式I-VIIまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学修飾を含むことができる。

標的 位置	標的	配列 番号	RPI 番号	別名	配列	配列 番号
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	HIV43:1399U21 siRNA sense	ACCAUCAUAGAGGAAGCUGTT	1483	
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2323U21 siRNA sense	UAGAUACAGGAGCAGAUGATT	1484	
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	HIV43:2328U21 siRNA sense	ACAGGAGCAGAUGAUACAGTT	1485	
4930	UUUGGAAAGGACCGACAAA	1	HIV43:4930U21 siRNA sense	UUUGGAAAGGACCGACAAAATT	1486	
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5077U21 siRNA sense	GUAGACAGGAUGAGGAUATT	1487	
5955	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	HIV43:5955U21 siRNA sense	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGCTT	1488	
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	HIV43:5982U21 siRNA sense	GCGGAGACAGCGACGAAGATT	1489	
8499	GCCUGUGGCCUUCUACGCUA	1478	HIV43:8499U21 siRNA sense	GCCUGUGCCUUCUACGCUATT	1490	
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) antisense	CAGCUCUCUCAUJAGUAGGUTT	1491	
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) antisense	UCAUCUJGUCUCCUJUATT	1492	
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) antisense	CUGUUAUCAUCUGCUCCUGUTT	1493	
4930	UUUGGAAAGGACCGACAAA	1	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) antisense	UUUGCUGGUCCUUCUCCAAATT	1494	
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) antisense	UAAUCCUCAUCCUGUCUACTT	1495	
5955	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) antisense	GCCAUAGGAGAUGCCUAAAGTT	1496	
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	HIV43:5900L21 siRNA (5982C) antisense	UCUUCGUCGCGUCUCCGGCTT	1497	
8499	GCCUGUGGCCUUCUACGCUA	1478	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) antisense	UAGCUGUAAGGGCACAGGCTT	1498	
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	HIV43:1399U21 siRNA stab04 sense	B AccAucAUAGAGGAAGcGTT B	1499	
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2323U21 siRNA stab04 sense	B uAGAUACAGGAGcAGAUcGATT B	1500	
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	HIV43:2328U21 siRNA stab04 sense	B AcAGGAGCAGAUAGAUAcGTT B	1501	
4930	UUUGGAAAGGACCGACAAA	1	HIV43:4930U21 siRNA stab04 sense	B uuuGGAAAGGAcAGcAAATT B	1502	
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5077U21 siRNA stab04 sense	B GuAGAcAGGAuGAGGAuuATT B	1503	
5955	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	HIV43:3955U21 siRNA stab04 sense	B cuuAGcAuuGuccuuAuGGcTT B	1504	
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B GcGGAGAcAGcAcGAGATT B	1505	
8499	GCCUGUGGCCUUCUACGCUA	1478	HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B GcuGuGccuucuAGcATT B	1506	
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab05 antisense	cAGcucucuJAUuGAuGGTtST	1507	
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab05 antisense	uAUuGuccuGuccuAUuJATST	1508	
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab05 antisense	cuGuAUuAcuGuuccuGuTtST	1509	
4930	UUUGGAAAGGACCGACAAA	1	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab05 antisense	uuuGucGuccuuccoAAATsT	1510	
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab05 antisense	uAAuccuAUuccuGuuAcTsT	1511	
5955	CUUAGGCAUCUCCUUAUGGC	99	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab05 antisense	GccuAGGAGAuGccuAAGTsT	1512	
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) stab05 antisense	ucuucGucGcuGuccuGcTsT	1513	
8499	GCCUGUGGCCUUCUACGCUA	1478	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab05 antisense	uAGcuGAAGGAGGcAcAGGcTsT	1514	
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	HIV43:1399U21 siRNA stab07 sense	B AccAucAUAGAGGAAGcGTT B	1515	

2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2323U21 siRNA stab07 sense	B uAGAuAcAGGAGCAGAU GATT B	1516
2328	ACAGGAGCAGCAGAUACAG	5	HIV43:2328U21 siRNA stab07 sense	B AcAGGAGCAGCAGAUACAG T B	1517
4930	UUUGGAAGGAGCAGCAA	1	HIV43:4930U21 siRNA stab07 sense	B uuuGGAAAGGAGCAGCAA ATT B	1518
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5077U21 siRNA stab07 sense	B GUAGACAGGAUGAGGAUUA ATT B	1519
5955	CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	HIV43:5955U21 siRNA stab07 sense	B cuuAGGCAUCUCUCAUAGGC T B	1520
5982	GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	HIV43:5982U21 siRNA stab07 sense	B GCGGAGACAGCAGCAAGA T B	1521
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	HIV43:8499U21 siRNA stab07 sense	B GccuGUGCCUCUUCAGCUA ATT B	1522
1399	ACCAUCAAUAGGGAAGCUG	36	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab11 antisense	cAGcuuccuAUuGAuGGuTsT	1523
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	HIV43:2323L21 siRNA (2323C) stab11 antisense	uAGcuuccuAUuGAuGGuTsT	1524
2328	ACAGGAGCAGCAGAUACAG	5	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab11 antisense	cuGUAGcAUuGcuuccuGUuTsT	1525
4930	UUUGGAAGGAGCAGCAA	1	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab11 antisense	uuuGcuGGcuuccuAAATsT	1526
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab11 antisense	uAGcuuccuAUuGcuuccuACTsT	1527
5955	CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab11 antisense	GccuAUAGGAGAUuGccuAAAGTsT	1528
5982	GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) stab11 antisense	ucuuccuGccuAUuGccuGGCTsT	1529
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab11 antisense	uAGcuGAAGGAGGcAGAGGCTsT	1530
AGGGGAAGGACAGACAGAAC	1479	30793	HIV:1484U21 siRNA stab04 sense	B GGGAAGGAGGAGAGGATT B	1531
CAGAGAUAGGAAAGGAAAGGAAA	1480	30794	HIV:2668U21 siRNA stab04 sense	B GAGAUAGGAAAGGAAAGGGATT B	1532
CUUUGGAGGAGGAGAUAGAGGG	1481	30795	HIV:7633U21 siRNA stab04 sense	B UGGAGGAGGAGAUuGAuGGGTT B	1533
CGGAAAACAAUAGGAGCAUCAC	1482	30796	HIV:8908U21 siRNA stab04 sense	B GGAAAAGAcAUuGAGcAAuCTsT	1534
AGGGGAAGGACAGACAGAAC	1479	30797	HIV:1502L21 siRNA (1484C) stab05 antisense	uccuGcuAUuGcuAcuuccCTsT	1535
CAGAGAUGGAAAAGGAAGGGAA	1480	30798	HIV:2684L21 siRNA (2666C) stab05 antisense	ucuccuuccuuccuAucuCTsT	1536
CUUUGGAGGAGGAGAUAGAGGA	1481	30799	HIV:7651L21 siRNA (7633C) stab05 antisense	ccuAUuAucuuccuaccATsT	1537
CGGAAAACAAUAGGAGCAUCAC	1482	30800	HIV:8924L21 siRNA (8906C) stab05 antisense	GAuGcuccuAUuGuuuuccCTsT	1538
ACCAUCAAUAGGAGAACUG	98	31218	HIV43:1399U21 siRNA stab09 sense	B CAGCUUCCUCAUUGAUAGGUTT B	1539
UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31219	HIV43:2323U21 siRNA stab09 sense	B UCAUCUGCUCUGUAUCUATT B	1540
ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31220	HIV43:2328U21 siRNA stab09 sense	B CUGUAUCAUCUGCUCCUGUTT B	1541
UUUGGAAAGGAGCAGCAA	1	31221	HIV43:4930U21 siRNA stab09 sense	B UUUCGUGGUCCUUIUCCAAATT B	1542
GUAGACAGGAGAUGAGGAUUA	4	31222	HIV43:5077U21 siRNA stab09 sense	B UAAUCCUCAUCCUGCUJACTT B	1543
CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	31223	HIV43:5955U21 siRNA stab09 sense	B GCCAUCAGGAGAUuGCUAAAGTsT	1544
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31224	HIV43:5982U21 siRNA stab09 sense	B UCUUCGUCGGUGUUCUCCGCTT B	1545
CCCGUGGCCUCUUCAGCUA	1478	31225	HIV43:8499U21 siRNA stab09 sense	B UAGCUGAAAGAGGACAGGGCTT B	1546
ACCAUCAAUAGGAGAACUG	36	31226	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab10 antisense	CAGCUUCCUCAUJGAuGGuTsT	1547
UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31227	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab10 antisense	UCAUCUGCUCCUGUAUCUATsT	1548
ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31228	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab10 antisense	CUGUAUCAUCUGCUCCUGUTsT	1549
UUUGGAAAGGAGCAGCAA	1	31229	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab10 antisense	UUUCGUGGUCCUUIUCCAAATsT	1550
GUAGACAGGAGAUGAGGAUUA	4	31230	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab10 antisense	UAAUCCUCAUCCUGUCUACTsT	1551
CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	31231	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab10 antisense	GCCAUCAGGAGAUuGCUAAAGTsT	1552
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31232	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) stab10 antisense	UCUUCGUCGGUGUUCUCCGCTsT	1553

GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31233	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab10 antisense	UAGCUGAAAGAGGCACAGGCTsT	1554
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31234	HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B ucuuccuGccuGccuccGcTT B	1555
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31235	HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTT B	1556
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31238	HIV43:5982U21 siRNA stab07 antisense	B ucuuccuGccuGccuccGcTT B	1557
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31239	HIV43:8499U21 siRNA stab07 antisense	B uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTT B	1558
ACCAUCAAUAGGAGAACUG	36	31242	HIV43:1399U21 siRNA Inv stab09 sense	B GUCGAAGGAGUuACUACATT B	1559
UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31243	HIV43:2323U21 siRNA Inv stab09 sense	B AGUAGACGAGGACACAUJAGAUUTT B	1560
ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31244	HIV43:2328U21 siRNA Inv stab09 sense	B GCAuAUAGAGCAGGAGACATT B	1561
UUUGGAAAGGAGCAGCAA	1	31245	HIV43:4930U21 siRNA Inv stab09 sense	B AAACGACCAGGAAAGGUUUTT B	1562
GUAGACAGGAGAUGAGGAUUA	4	31246	HIV43:5077U21 siRNA Inv stab09 sense	B AUUAGGAGUuAGGACAGAUuGTT B	1563
CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	31247	HIV43:5955U21 siRNA Inv stab09 sense	B CGGUAUCCUCAuJCGGAuUUCTT B	1564
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31248	HIV43:5982U21 siRNA Inv stab09 sense	B AGAAAGCAGGAGCACAGGGCGTT B	1565
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31249	HIV43:8499U21 siRNA Inv stab09 sense	B AUCGACUUCUCCGUGUCCGTT B	1566
ACCAUCAAUAGGAGAACUG	36	31250	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) Inv stab10 antisense	B GAGUAGGUuACUCCUUCGACTsT	1567
UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31251	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) Inv stab10 antisense	AUCUAUGUUCUCGUCUACUTsT	1568
ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31252	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) Inv stab10 antisense	UGUUCUCGUCUACAUuGJLCTsT	1569
UUUGGAAAGGAGCAGCAA	1	31253	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) Inv stab10 antisense	AAACUUUUCUCCUGGUUCGUUUTsT	1570
GUAGACAGGAGAUGAGGAUUA	4	31254	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) Inv stab10 antisense	CAUCGUAGGUuACUCCUAAUTsT	1571
CUUAGGCAUCUCUCAUAGGC	99	31255	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) Inv stab10 antisense	GAAUCGGUAGAGGUuACCGTsT	1572
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31256	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) Inv stab10 antisense	CGCCUCUGLUGCUGCUUCUTsT	1573
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31257	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) Inv stab10 antisense	CGGGACAGGGAGAAAGUCGGAuUTsT	1574
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31258	HIV43:5982U21 siRNA Inv stab04 sense	B AGAAAGcAcGcAcAGAGGcTT B	1575
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31259	HIV43:8499U21 siRNA Inv stab04 sense	B AucGAcuuccuGccuccGTT B	1576
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31260	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) Inv stab05 antisense	cGccuccuGccuccGccuauTsT	1577
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31261	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) Inv stab05 antisense	cGGAcAcGGAGAAuGcAuTsT	1578
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31262	HIV43:5982U21 siRNA Inv stab07 sense	B AGAAGcAcGcAcAGAGGCGTT B	1579
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31263	HIV43:8499U21 siRNA Inv stab07 sense	B AucGAcuuccuGccuccGTT B	1580
GCGGAGACAGCAGCAAGA	1477	31264	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) Inv stab11 antisense	cGccuccuGccuccGccuauTsT	1581
GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31265	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) Inv stab11 antisense	cGGAcAcGGAGAAuGcAuTsT	1582

大文字 = リボヌクレオチド

U,c = 2'-デオキシ-2'-フルオロ U,C

T = チミジン

B = 反転デオキシ無塩基

S = ホスホロチオエート結合

A = デオキシアデノシン

G = デオキシグアノシン

【表 3.2】

表IV

化学的に修飾された siNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ、例えば、図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミジン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21 ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 3.3】

表V

A. 2.5 μmol 合成サイクル ABI 394 装置					
試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホアミダート	15	31 μL	45 sec	233 sec	465 sec
S-エチルアミダート	38.7	31 μL	45 sec	233 min	465 sec
新水酢酸	65.5	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
フルオルミダート	124.5	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	70.0	732 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.8	244 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ボーナー	7.7	232 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセニトリル	NA	2.84 mL	NA	NA	NA

B. 0.2 μmol 合成サイクル ABI 394 装置					
試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホアミダート	15	31 μL	45 sec	233 sec	465 sec
S-エチルアミダート	38.7	31 μL	45 sec	233 min	465 sec
新水酢酸	65.5	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
フルオルミダート	124.5	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	70.0	732 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.8	244 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ボーナー	7.7	232 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセニトリル	NA	2.84 mL	NA	NA	NA

【0383】

待機時間は輸送の間の接触時間は含まれない

・ ジテム合成にはリンク分子のダブルカップリングを利用する

【図面の簡単な説明】

【0384】

【図 1】図 1 は、 siNA 分子を合成するスキームの例を示す。
【図 2】図 2 は、本発明の方法により合成された精製 siNA デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。
【図 3】図 3 は、 RNAi に関する標的 RNA 分解の提唱されるメカニズムの例を示す。

NAのヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む。請求項1記載のs₁NA分子。

【請求項5】

s₁NA分子の各鎖は約1'9-約2'3ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドを補助的な少なくとも約1'9ヌクレオチドを含む。請求項4記載のs₁NA分子。

【請求項6】

前記s₁NA分子はH₁V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み、前記s₁NAはさらにセンス領域を含み、前記センス領域は前記H₁V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む。請求項1記載のs₁NA分子。

【請求項7】

前記アンチセンス領域は約1'9-約2'3ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス領域はセンス領域および前記センス領域は約1'9-約2'3ヌクレオチドに相補的な少なくとも約1'9ヌクレオチドを含む。請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項8】

前記s₁NA分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み、前記アンチセンス領域はH₁V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含む、および前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む。請求項1記載のs₁NA分子。

【請求項9】

前記s₁NA分子は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、一方のフラグメントは前記s₁NA分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記s₁NA分子のアンチセンス領域を含む。請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項10】

前記センス領域がリンクカーモーティブを介してアンチセンス領域と連結されている、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項11】

前記リンクカーモーティブがオリゴヌクレオチドリンクカーモーティブである、請求項10記載のs₁NA分子。

【請求項12】

前記リンクカーモーティブが非ヌクレオチドリンクカーモーティブである、請求項10記載のs₁NA分子。

【請求項13】

センス領域中のビリミジンヌクレオチドが2'-0-メチルビリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項14】

センス領域中のヌクレオチドが2'-デオキシブリンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項15】

センス領域中に存在するビリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項16】

前記センス領域を含むフラグメントは、前記センス領域を含むフラグメントの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キャップ成分を含む。請求項9記載のs₁NA分子。

【請求項17】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16記載のs₁NA分子。前記アンチセンス領域のビリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項18】

前記アンチセンス領域のビリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項19】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが2'-0-メチルプリンヌクレオチドである、請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項20】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオチドを含む。請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項21】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド開結合を含む。請求項18記載のs₁NA分子。

【請求項22】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にグリセリル修飾を含む。請求項6記載のs₁NA分子。

【請求項23】

前記s₁NA分子の2つのフラグメントのそれぞれが約2'1ヌクレオチドを含む。請求項9記載のs₁NA分子。

【請求項24】

s₁NA分子の各フラグメントの約1'9ヌクレオチドはs₁NA分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成しており、s₁NA分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドはs₁NA分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成していない。請求項23記載のs₁NA分子。

【請求項25】

s₁NA分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドのそれぞれが2'-デオキシビリミジンである。請求項24記載のs₁NA分子。

【請求項26】

前記2'-デオキシビリミジンが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンである。請求項25記載のs₁NA分子。

【請求項27】

s₁NA分子の各フラグメントの約2'1ヌクレオチドすべてがs₁NA分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成している。請求項23記載のs₁NA分子。

【請求項28】

アンチセンス領域の約1'9ヌクレオチドがH₁V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している。請求項23記載のs₁NA分子。

【請求項29】

アンチセンス領域の約2'1ヌクレオチドがH₁V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している。請求項23記載のs₁NA分子。

【請求項30】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの5'末端が任意にリン酸基を含む。請求項9記載のs₁NA分子。

【請求項31】

生物学的に許容しうる担体または希臘剤中に請求項1記載のs₁NA分子を含む組成物。

【請求項32】

H₁V RNAがH₁V-1 RNAを含む。請求項1記載のs₁NA。

【請求項33】

前記s₁NAが、配列番号1-1604のいずれかを含む。請求項1記載のs₁NA。

【請求項34】

請求項32記載のs₁NAを薬学的に許容しうる担体または希臘剤とともに含む組成物。

【請求項35】

請求項33記載のs₁NAを薬学的に許容しうる担体または希臘剤とともに含む組成物。

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 10/157,580
 (32) 優先日 平成14年5月29日(2002.5.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/366,782
 (32) 優先日 平成14年5月6日(2002.5.6)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/398,036
 (32) 優先日 平成14年7月23日(2002.7.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 10/225,023
 (32) 優先日 平成14年8月21日(2002.8.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/406,784
 (32) 優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/408,378
 (32) 優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/418,293
 (32) 優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/440,129
 (32) 優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(GH, GL, YE, LS, MM, MZ, SO, SL, SZ, TZ, KG, ZM, ZD), BG(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), EP(GT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GR, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), GR(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, SN, GU, OM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BE, GA, CH, CN, CO, CR, CL, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GR, GD, GE, GH, GR, HR, ID, IL, IM, IS, JP, KE, KG, KR, KR, KZ, LC, LI, LR, LS, LT, LU, IV, MA, MD, MG, MR, MM, MW, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TZ, UA, UC, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW)

(74) 代理人 100114465
 持理士 北野 健

(72)発明者 マクスウェイデン, ジェームズ
 アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボルダー, フランクリン ドライブ 4866

(72)発明者 ベーシエルマン, レオニド
 アメリカ合衆国 80503 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5530

(72)発明者 メスジヤト, デニス
 アメリカ合衆国 80004 コロラド州 アーヴィング, ユニオン ストリート 6595
 Fターム(参考) 48024 A001 A020 C011 C202 H017 H020
 40086 A001 A003 A004 EA17 MA01 MA04 MA14 ZR33 ZC55

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年3月30日(2006.3.30)

【公表番号】特表2006-502694(P2006-502694A)

【公表日】平成18年1月26日(2006.1.26)

【年通号】公開・登録公報2006-004

【出願番号】特願2003-569153(P2003-569153)

【国際特許分類】

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/705 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

【F1】

C12N 15/00 Z N A A

A61K 31/7105

A61P 31/18

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月8日(2006.2.8)

【手続補正1】

【補正対象物類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

R N A 干渉 (R N A I) によりヒト免疫不全ウイルス (H I V) R N A の切断を指示する
化学的に合成された二本鎖短干渉核酸 (s i N A) 分子であつて、

a. 前記 s i N A 分子の各鎖は 1'8 - 2'7 マクレオチドの長さであり；

b. 前記 s i N A 分子のアンチセンス鎖は前記 H I V R N A のヌクレオチド配列に相
補的なヌクレオチド配列を含み；センス鎖はアンチセンス鎖に相補的であり；および

c. 前記 s i N A 分子は、センス鎖の 5' 末端および / または 3' 末端およびアンチセ
ンス鎖の 3' 末端に少なくとも 1 つ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオ
チドを含む、ことを特徴とする s i N A 分子。

【請求項2】

前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項3】

前記 s i N A 分子が 1 またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項4】

前記 s i N A 分子が 1 またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記
載の s i N A 分子。

【請求項5】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチドを含む、請求項1記
載の s i N A 分子。

【請求項6】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを
含む、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項7】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが 2' - 0 - メチルヌクレオチドを含む、請求項1
記載の s i N A 分子。

前記化学的に修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、
請求項1記載の s i N A 分子。

前記非ヌクレオチドが無塩基成分を含む、請求項1記載の s i N A 分子。

前記無塩基成分が反転デオキシ無塩基成分を含む、請求項8記載の s i N A 分子。

前記非ヌクレオチドがグリセリル成分を含む、請求項1記載の s i N A 分子。

前記非ヌクレオチドを含む、請求項1記載の s i N A 分子。

前記 s i N A 分子の各鎖が 1'9 - 2'3 ナクレオチドを含み、各鎖が他方の鎖のヌクレオチドと
相補的な少なくとも 1'9 ナクレオチドを含む、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項12】

前記 s i N A 分子が 2 つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられてお
り、一方のフラグメントは前記 s i N A 分子のセンス領域を含み、第 2 のフラグメントは
前記 s i N A 分子のアンチセンス領域を含む、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項13】

前記センス領域がリンク分子を介してアンチセンス領域に連結されている、請求項1記
載の s i N A 分子。

【請求項14】

前記リンク分子がボリヌクレオチドリンク分子である、請求項13記載の s i N A 分子。

【請求項15】

前記リンク分子が非ヌクレオチドリンク分子である、請求項13記載の s i N A 分子。

【請求項16】

前記センス領域中のピリミジンヌクレオチドが 2' - 0 - メチルピリミジンヌクレオチドであ
る、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項17】

前記センス領域中のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである、請求項
1記載の s i N A 分子。

【請求項18】

前記センス領域中に存在するピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリ
ミジンヌクレオチドである、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項19】

前記センス領域を含むフラグメントが、前記センス領域を含むフラグメントの 5' 末端,
3' 末端、または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キャップ成分を含む、請求項12
記載の s i N A 分子。

【請求項20】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項19記載の s i N A 分子
。

【請求項21】

前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリ
ミジンヌクレオチドである、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項22】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが 2' - 0 - メチルプリンヌクレオチドであ
る、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項23】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが 2' - デオキシ - プリンヌクレ
オチドを含む、請求項1記載の s i N A 分子。

【請求項24】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレ
オチド間結合を含む、請求項21記載の s i N A 分子。

【請求項 2-5】
前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にグリセリル修飾を含む、請求項 1 記載の s₁NA 分子。

【請求項 2-6】

前記 s₁NA 分子の 2 つのフラグメントのそれぞれが 2' ～ 3' クレオチドを含む、請求項 1 2 記載の s₁NA 分子。

【請求項 2-7】

s₁NA 分子の各フラグメントの約 1/9 クレオチドは s₁NA 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s₁NA 分子の各フラグメントの少なくとも 2 つの 3' 末端ヌクレオチドは s₁NA 分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項 2-6 記載の s₁NA 分子。

【請求項 2-8】

s₁NA 分子の各フラグメントの 2 つの 3' 末端ヌクレオチドのそれぞれが 2' ～ 3' クレオチドの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s₁NA 分子。

【請求項 2-9】

前記 2' ～ 3' クレオキシーピリミジンが 2' ～ 3' クレオキシーピリミジンである、請求項 2-8 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-0】

s₁NA 分子の各フラグメントの 2' ～ 3' クレオチドのすべてが s₁NA 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項 2-6 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-1】

アンチセンス領域の 1/9 クレオチドが H_{IV} 遺伝子またはその一部によりコードされる RNA のヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項 2-6 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-2】

アンチセンス領域の 2 1/9 クレオチドが H_{IV} 遺伝子またはその一部によりコードされる RNA のヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項 2-6 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-3】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの 5' 末端が任意にリン酸基を含む、請求項 1 2 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-4】

H_{IV} RNA が H_{IV} - RNA を含む、請求項 1 記載の s₁NA 分子。

【請求項 3-5】

許容可能な担体または希釈剤中に請求項 1 記載の s₁NA 分子を含む医薬組成物。